

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DE CIANOBACTERIAS POR
HONGOS LIQUENIZADOS FORMADORES DE CIANOLÍQUENES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Eva María Díaz Peña

Director

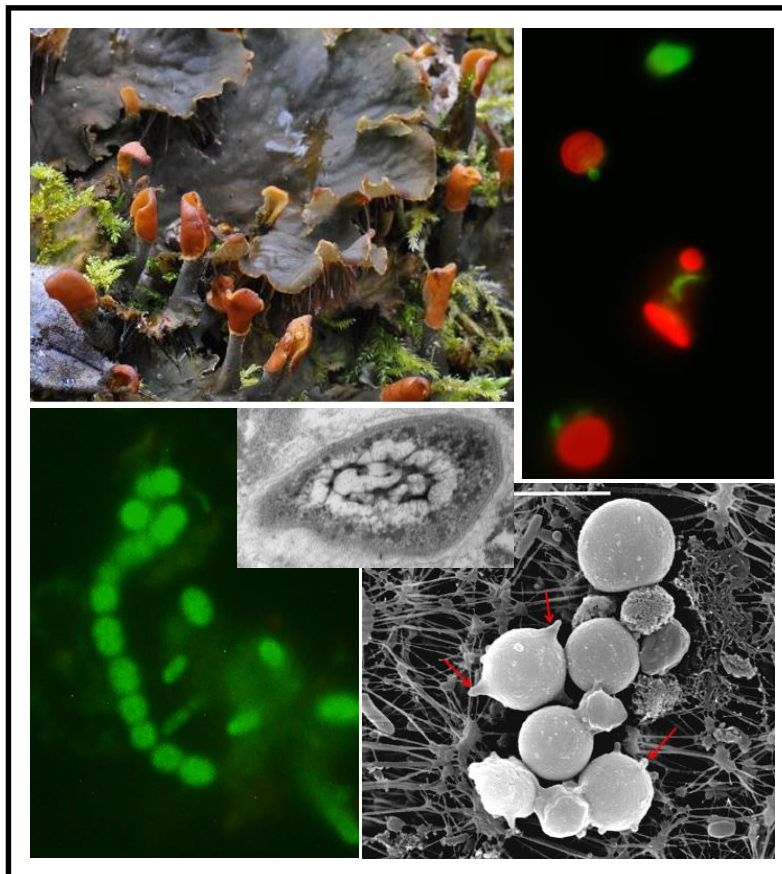
Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I
(CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL)



MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DE CIANOBACTERIAS POR HONGOS LIQUENIZADOS FORMADORES DE CIANOLÍQUENES



TESIS DOCTORAL
EVA MARÍA DÍAZ PEÑA
MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Departamento de
Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal)**



**MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DE CIANOBACTERIAS
POR HONGOS LIQUENIZADOS FORMADORES DE
CIANOLÍQUENES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Eva María Díaz Peña

Bajo la dirección del Profesor Doctor

D. Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Departamento de
Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal)



Escudo del grupo de investigación "The Lichen-Cane Team", realizado por D. Manuel García Fernández

MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DE CIANOBACTERIAS POR
HONGOS LIQUENIZADOS FORMADORES DE CIANOLÍQUENES

EVA MARÍA DÍAZ PEÑA

Madrid, 2014

EVA MARÍA DÍAZ PEÑA

**MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DE CIANOBACTERIAS
POR HONGOS LIQUENIZADOS FORMADORES DE
CIANOLÍQUENES**

Director

Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba

**Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias
Biológicas**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Vegetal I

(Fisiología Vegetal)

Madrid, 2014

Trabajo realizado en Grupo de Investigación validado Señalización Celular en Simbiosis Vegetales del Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, que se presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Junio de 2014

Fdo. : Eva María Díaz Peña

Conforme, el director de Tesis

Fdo.: Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba

AGRADECIMIENTOS

El último curso de carrera vivía con la ilusión de ver el final de una etapa, una dura etapa en la que te crees que no hay nada más difícil en la vida que terminar una Licenciatura (qué poco sabía de la vida...). Nunca me planteé hacer una Tesis o ejercer de bióloga, porque, el adquirir conocimientos era un placer en sí mismo y es lo que he hecho desde que tengo uso de razón. Ya sé que no te aporta beneficios económicos pero la recompensa personal bien merece todo el esfuerzo. Todo esto cambió cuando subí a la 5ª planta del edificio nuevo de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, en concreto el Laboratorio 1. Allí estaba el Lichen-Cane Team. Conocer al Profesor Dr. D. Carlos Vicente Córdoba me cambió la vida. Descubrir su forma de trabajar me dejó fascinada desde el primer día. Tanto que el realizar una Tesis se convirtió en mi objetivo. Nunca podré agradecerte lo suficiente todos estos años, Carlos. Gracias por abrirme las puertas de “vuestra casa”, por enseñarme tanto, por tu paciencia y cariño. Porque para mí eres la definición de MAESTRO con mayúsculas. Fuente inagotable de conocimiento que tiene explicación para todo, pero siempre, con una humildad genuina. Gracias por ayudarme y formarme para el mañana. Te admiro como profesor y mucho más como persona, porque (aunque no sé si es políticamente correcto decirlo), YO SOY FAN. Unos cuantos años después, lo único que puedo hacer es repetir aquellas palabras que me dijiste en respuesta a mi e-mail sobre trabajar con vosotros: ...“Mi jefe, que es un hombre sabio, me enseñó a trabajar. Mi jefe, que es un hombre bueno, me trató con afecto, con paciencia y con respeto. Yo lo único que hago es imitarlo en la medida de mis posibilidades”..... ¡Gracias CVC!

A veces los sueños se cumplen o mejor dicho, los milagros se hacen realidad. Así me sentí el día que me dieron una beca para poder realizar la Tesis Doctoral. Tengo que agradecer el apoyo y ayuda ilimitados de la Prof. Dra. Dª María Estrella Legaz González. Su fuerza y su confianza depositada en mí me han hecho ser fuerte en los momentos de duda, porque una Tesis no es sólo hacer unos experimentos, es mucho, muchísimo más. Son muchas horas y días de tu vida donde haces eso, vivir. Defensora a ultranza de la Ciencia “Básica”, su pasión por el trabajo bien hecho es infinita, sólo igualada a su pasión por formar nuevos investigadores. Eres una inspiración para todos los que queremos dedicarnos a la Ciencia. Gracias.

No podía faltar en estos agradecimientos especiales la Prof. Dra. Dª Blanca Fontaniella, ejemplo de buena docente y mejor persona. Gracias por nuestras conversaciones en la “narco-sala”, tus maravillosos apuntes de prácticas y porque no sabes cuánto me animabas durante la escritura de esta Tesis con tu: ¡Cómo vas hoy?

No importa el tiempo que pasas cerca de una persona para admirarla y ver en ella un buen profesor, de esos que dan una clase magistral el mismo día que se pone su bata para explicar al nuevo becario cómo se hace un Lowry. Así es el Prof. Dr. D. Roberto de Armas. Muchas gracias por tu ayuda, tus conocimientos y tus historias por las Universidades del mundo. He aprendido mucho escuchándote. Para continuar agradecer: al Pr. Dr. D. Miguel Vicente-Manzanares por sus ideas e instalaciones en estos tiempos de crisis; la Prof. Dr. D^a Ana Rosa Burgaz por la identificación de los líquenes utilizados y la Prof. Dra. D^a Carmina Gómez por ayudarme con la recolección.

Así mismo, dar las gracias al Prf. Dr. D. Christophe Ampe de la Universidad de Gante, por darme la oportunidad de poder desarrollar parte de esta Tesis en otro laboratorio, otro país, otro idioma, que junto a la Dra. D^a. Marleen Van Troys, supieron entender “mis” cianobacterias y desde el primer día me ayudaron enseñándome nuevas técnicas de Biología Molecular que luego hemos puesto a punto en nuestro centro de trabajo. Porque si ya es difícil adaptarse a un sitio nuevo, cuando todos los carteles están en Neerlandés elevan la “estancia breve” a la categoría de reto, por eso, no puedo dejar de nombrar a Dalma, Miriam y Tünde por dejarme formar parte de su Erasmus-experience, nunca olvidaré nuestros viajes en tren y nuestras bicis rojas. Köszönöm! y Daniel, un manchego que se fue a estudiar las caspasas a Gante y no volvió, porque comer a las 14:00 sienta muy bien y si es acompañado mejor. ¡Suerte amigo!

Siempre estaré eternamente agradecida a mis compañeros porque desde el primer día hemos trabajado como un EQUIPO: Rocío, Mara, María, Susana, Julia, Borja, Elena, Pablo, Sheyla, Talitha, Rafaella, Roberto, Carmen, los “mini becarios”....gracias por aquellas interminables tardes con el micrótomo, el Congreso de Lugo, Brasil, Florencia, las zafras, nuestras queridas columnas G-10 y G-50 (siempre trabajando juntas), los brigadeiros, los paseos “guiados” por Madrid, la boda, nuestras algas fluorescentes, los “cumplis”, los “invis” los días malos, los días buenos, las tardes.. ¡y a veces hasta las noches! Espero haberos aportado una décima parte de todo lo que me habéis dado a mí, ¡mucho suerte a todos amigos!

Quiero dar las gracias a mi familia y amigos por todo su apoyo y por supuesto a mis padres y hermano, por todos mis años de estudio y esfuerzos. Siempre unidos y compartiendo los buenos y malos momentos. José, Raquel, Alberto, Sergio, Lourdes, Ana, Alejandra, Irene, las “chicas de la Plaza”, mis compis del “Bellas Vistas”especialmente mis primas Natalia y Rocío (¿Qué haría yo sin vosotras?), gracias por quererme como soy.

A veces las cosas coinciden y son esas coincidencias las que dan sentido a la vida o no (¿quién sabe?). Como mi primera sobrina Luna, que fue a nacer a 1556 kilómetros de distancia un día lluvioso de Abril mientras estaba haciendo una electroforesis en tierras Flamencas. Nunca olvidaré el día en el hospital vía Skype, tus baños y tus primeras sonrisas.

Por supuesto a Manuel, mi amor, mi amigo, mi compañero de viaje. La luz que nunca se apaga. GRACIAS por tu paciencia y tu apoyo incondicional. Como le dijo un famoso trompetista de Jazz a su mejor amigo “eres la otra mitad de mi latido”. ♥

Agradecer (y mucho) a ti, liquen, ser extraordinario donde los haya, capaz de conquistar los lugares más inhóspitos y paradigma del famoso dicho “La unión hace la fuerza”.

De nuevo, me gustaría volver al principio y terminar con un fragmento de una película de Kung-fu, (¡sí!, Kung-fu). Es la mejor forma que he encontrado para expresar mi gratitud, porque (científicamente hablando), todo empieza y acaba en ti.

-Maestro: “Según dicen maestro y aprendiz recorren el camino juntos compartiendo el destino hasta que sus caminos se separan”

-Aprendiz: “¡Jamás le olvidaré!”

-Maestro: “Seguramente eso es lo que signifique ser inmortal”...

¡GRACIAS A TODOS!

Fdo.: Eva María Díaz Peña

(Doctoranda nº29 del Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba).

***Dedicado a Data,
donde quiera que estés.***

"La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante".

Miguel de Unamuno (1864 – 1936)

"Siempre hay mil soles en el reverso de las nubes".

Proverbio indio

A-22	S-(3,4-dicholobencil) isotiourea
ABP	Algal Binding Protein
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato -3',5' ciclico
ADP	Adenosín difosfato
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BHT	butilhidroxitolueno
Ble	Blebistatina
BSA	seroalbumina bovina
CEF	Células embrionarias de Fibroblastos de ratón
CHO	Células de ovario de hámster chino
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
GAP	GTPase activating proteins
GEF	Guanosine nucleotide Exchange factors
GDI	GDP-dissociation inhibitor
GDP	guanosin difosfato
GDPβ(s)	Guanosin 5'-(β -thio) difosfato
GTP	guanosin trifosfato
GTPγ(s)	Guanosin 5'-O-(γ -tio)trifosfato
F0	Fluorescencia basal
Fal	Faloidina
Fm	Fluorescencia máxima
FMA	Intensidad de Fluorescencia máxima
FME	Intensidad de Fluorescencia media
FMI	Intensidad de Fluorescencia mínima
Fv	(Fluorescencia máxima)-(Fluorecenica basal)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-1 piperazina etansulfónico
HIF	Factor de inducción de hormogonia
HRF	Factor de reconocimiento de hormogonios
IEF	Isoelectric Focusing
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
ITFC	Isotiocianato de Fluoresceína
MDA	Malondialdehído
MYH	Myosin Heavy Chain

MLC	Myosin Light Chain
NMHC	Nonmuscle myosin Heavy Chain
PAGE	Poliacrylamide Gel Electrophoresis
PATAg	Acido Peryodico-Tiocarbohidrazida de Plata
PBS	Tampón fosfato salino
pI	Punto Isoeléctrico
PSII	Fotosistema II
Put	Putrescina
PVP	polivinilpirrolidona
RLC	Cadena ligera reguladora
ROI	Region Of Interest
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAE	Arginasa Segregable de <i>Evernia prunastri</i>
SAX	Arginasa Segregable de <i>Xantoria parietina</i>
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBS	Tampón TRIS
TCA	Ácido tiobarbiturico
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TEMED	N',N', N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ASPECTOS GENERALES	3
1.1. Componentes de la simbiosis líquénica	3
1.2. El talo líquénico	5
1.3. Interacción entre biontes	6
1.4. Síntesis de compuestos secundarios	8
1.5. Metabolismo de la urea en líquenes	10
2. DETERMINANTES MOLECULARES DEL RECONOCIMIENTO ENTRE BIONTES .	11
2.1. Lectinas líquénicas: glicoproteínas producidas por el micobionte	12
2.2. Especificidad de las lectinas	15
2.3. El hongo liquenizado produce lectinas con diferentes roles	16
2.4. Receptor específico para lectinas	18
2.5. Lectina fúngica, ¿sustancia quimioattractante para los fotobiontes?.....	19
3. COMPATIBILIDAD COMO RECONOCIMIENTO ENTRE BIONTES FRENTE A INCOMPATIBILIDAD COMO DESCRIMINACIÓN CELULAR	20
3.1. Incompatibilidad del fotobionte frente a un hongo liquenizado	22
3.2. Eliminación de algas incompatibles mediante muerte programada	23
4. EL RECONOCIMIENTO CONTINUO ENTRE BIONTES GARANTIZA EL MANTENIMIENTO DE LA ASOCIACIÓN	24
5. MECANISMO DE RECONOCIMIENTO EN CIANOLIQUENES.....	25
6. MOTILIDAD DEL CIANOBIOTE	28
6.1. Tipos de movimiento.....	29
6.2. Hipótesis sobre el desplazamiento de las cianobacterias	31
7. IMPLICACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL DESPLAZAMIENTO DE LOS CIANOBIOTES	36
7.1. Organización de los filamentos de actina.....	37
7.2. MreB o actina bacteriana	41

7.3. ATPasas, motores moleculares del desplazamiento	45
8. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EN EL MOVIMIENTO DE LOS CIANOBIONTES	
.....	49
8.1. Implicación del AMPc en el movimiento celular	50
8.2. GTPasas, reguladores del citoesqueleto	51
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. MATERIAL BIOLÓGICO	61
1.1. Cianolíquenes	61
1.2. Clorolíquen	61
2. AISLAMIENTO DEL FOTOBIONTE	62
2.1. Aislamiento de cianobiontes de <i>P. canina</i>	61
2.2. Aislamiento de clorobiontes de <i>E. prunastri</i>	62
3. DETERMINANTES MOLECULARES DEL RECONOCIMIENTO ENTRE BIONTES ...	62
3.1. Localización citoquímica de la actividad ureasa y observación por Microscopía óptica	
.....	62
4. INDUCCIÓN DE ARGINASA SEGREGABLE	64
4.1. Obtención de lectina fúngica en <i>P. canina</i>	64
4.2. Obtención de lectina fúngica en <i>E. prunastri</i>	65
4.3. Valoración de proteínas	65
4.4. Aislamiento de arginasa segregable por cromatografía de afinidad	65
4.4.1. Inducción de ureasa en <i>E. prutastri</i>	65
4.5. Actividad arginasa	68
4.6. Análisis comparativo de la lectina fúngica de <i>P. canina</i> y <i>E. prunastri</i> mediante	
electroforesis proteica	69
4.6.1. Revelado de los geles	69

5. PURIFICACIÓN DE UREASA PRESENTE EN PARED	70
5.1 Obtención de ureasa	70
5.2. Aislamiento de ureasa por cromatografía de afinidad	71
6. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE LOS CIANOBIONTES	72
6.1. Marcaje de arginasa con fluoresceína (ITFC)	72
6.2. Unión de lectina segregable marcada con ITFC a cianobiontes	73
6.3. Desorción de lectina marcada unida a la pared celular	73
6.4. Microscopía de Fluorescencia	74
7. ENSAYOS DE LIGAMIENTO CRUZADO ENTRE FOTOBIONTES DE <i>PELTIGERA</i> Y <i>EVERNIA</i> SOBRE LECTINA FÚNGICA	74
7.1. Incubación con arginasa-ITFC y desorción de lectina marcada unida a la pared celular	74
7.2. Determinación de afinidad	75
7.3. Unión de lectina-ITCF a fotobiontes incubados con α -galactosidasa	77
7.4. Determinación de la concentración de galactosa	78
8. ESTUDIO DE INCOMPATIBILIDAD IN VITRO EN PRESENCIA DE PUTRESCINA ...	78
8.1. Actividad del fotosistema II (PSII)	78
8.2. Análisis de la clorofila a	79
8.3. Determinación de la peroxidación lipídica	79
8.4. Determinación de la actividad glucanasa	80
9. ENSAYOS DE QUIMIOATRACCIÓN DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE CIANOBIONTES	81
9.1. Verificación de la existencia de desplazamiento quimiotáctico del cianobionte hacia la lectina fúngica	81
9.2. Efecto de la luz sobre el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica	82
9.3. Valoración del efecto dosis-respuesta del desplazamiento quimiotáctico del cianobionte frente diferentes concentraciones de lectina fúngica	82
10. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS CIANOBIONTES	83
10.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	83
10.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	83

11. VALORACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO SOBRE EL MOVIMIENTO DEL CIANOBIOTE	84
11.1. Evaluación del efecto de S-(3,4-dicholobencil) isotiourea o A-22, inhibidor del citoesqueleto bacteriano	84
11.2. Evaluación del efecto de inhibidores de actina y miosina	85
12. VALORACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO SOBRE EL MOVIMIENTO DEL CIANOBIOTE	87
12.1. Estudio del efecto de los inhibidores del citoesqueleto sobre la tinción con faloidina-ITFC	87
12.2. Cuantificación de la fluorescencia	88
13. ESTUDIO PROTEICO A PARTIR DE CIANOBIOTES DE <i>P. CANINA</i>	89
13.1. Actina o proteínas homólogas	89
13.1.1. Obtención del contenido proteico	89
13.1.2. Determinación de la concentración de proteínas	90
13.1.3. Separación de proteínas por SSD-PAGE para la identificación de actina o proteínas homólogas	90
13.1.4. Revelado de los geles de electroforesis	92
13.1.5. Electroforesis 2D para el estudio de la actina o proteínas homólogas	93
13.1.6. Localización de actina en el cianobionte	96
13.1.6.1. Marcaje del citoesqueleto con ferritina	96
13.1.6.1. Localización de actina con anti- β -actina unida a ferritina	97
13.1.7. Microscopía confocal	97
13.2. Identificación de miosina o proteínas homólogas	98
13.2.1. Obtención del contenido proteico	98
13.2.2. Determinación de la concentración de proteínas	98
13.2.3. Separación de proteínas por SSD-PAGE para la identificación de miosina o proteínas homólogas	99
13.2.4. Estudio de la fosforilación de miosina o proteínas homologas en los cianobiontes	101
13.2.5. Localización de miosina en el cianobionte con anti-fosfo miosina MLC (Ser 19)	102

14. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LAS CIANOBACTERIAS	103
14.1. Valoración de la participación del AMPc y GTP en el proceso de desplazamiento de los cianobiontes	103
14.2. Efecto de análogos del GTP como GTP γ (s) y GDP β (s) sobre cianobacterias tratadas con blebistatina y faloidina	105
RESULTADOS	107
1. MORFOLOGÍA DE CIANOBIOTES DE <i>P. CANINA</i>	109
2. DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE LA ENZIMA UREASA	109
3. LA LECTINA FÚNGICA DE <i>P. CANINA</i> RECONOCE UREASA PURIFICADA DEL LÍQUEN <i>E. PRUNASTRI</i>	111
4. UREASA	113
4.1. Actividad ureasa positiva en los cianobiontes de <i>P. canina</i>	113
4.2. Residuos específicos de azúcares en la ureasa de pared en los cianobiontes ...	114
5. ARGINASA SEGREGABLE DE <i>P. CANINA</i> RECONOCE UREASA POLIGALACTOSILADA PRESENTE EN LAS PAREDES DE LOS CIANOBIOTES COMO LIGANDO.....	116
5.1. Unión de lectina marcada con ITCF a los cianobiontes	116
5.2. Arginasa secretada de <i>P. canina</i> es capaz de unirse a fotobiontes de <i>E. prunastri</i> así como la lectina fúngica de <i>Evernia</i> reconoce cianobiontes de <i>Peltigera</i>	119
5.3. La afinidad entre receptor del fotobionte es diferente para las distintas lectinas fúngicas	120
5.4. Valoración de azúcares liberados por la acción de la α -galactosidasa sobre la pared celular de los fotobiontes.....	122
6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS DE ARGINASAS DE <i>PELTIGERA</i> Y <i>EVERNIA</i>	125
7. LA PUTRESCINA PROVOCA CAMBIOS EN EL APARATO FOTOSINTETICO DE LOS FOTOBIONTES DE <i>P. CANINA</i>	127
8. EFECTO DE QUIMIOTRACCIÓN PRODUCIDO POR LA LECTINA FÚNGICA	131

8.1. Los cianobiontes de <i>P. canina</i> son atraídos hacia a una concentración conocida de arginasa producida por el mismo líquen	131
8.2. La luz influye en el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica	136
9. LOS CIANOBIOTES NO PRESENTAN ORGANULOS O FIMBRIAS PARA SU DESPLAZAMIENTO	137
9.1. Microscopía de barrido	137
9.2. Microscopía de transmisión	139
10. A-22: INHIBIDOR DE MreB, NO INHIBE LA MOTILIDAD DE LOS CIANOBIOTNES DE P. CANINA	141
11. LOS INHIBIDORES DE LA ACTINA Y MIOSINA EUCARIOTA DISMINUYEN LA MOVILIDAD DE LOS CIANOBIOTES HACIA LA LECTINA FÚNGICA	142
12. LA TINCIÓN CON FALOIDINA-ITCF NO ES IGUAL EN TODA LA SUPERFICIE DE LAS CIANOBACTERIAS	146
12.1. Microscopía de fluorescencia	146
12.2. Cuantificación de la fluorescencia.....	148
13. ANTICUERPOS DE ACTINA SE UNEN A EPITOPOS ESPECÍFICOS EN CIANOBIOTES DE P. CANINA.....	150
13.1. Concentración de proteínas totales en los cianobiontes	150
13.2. Estudio de la actina o proteínas similares por electroforesis	150
13.2.1. Electroforesis 2D, actina	153
13.3. Distribución espacial de la actina presente en el citoesqueleto mediante el anticuerpo anti- β -actina unido a ferritina	155
13.4. Distribución espacial de la actina mediante microscopía confocal	157
14. ANTICUERPOS DE MIOSINA SE UNEN A EPITOPOS ESPECÍFICOS EN CIANOBIOTES DE P. CANINA.....	160
15. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGUALCIÓN DE LA MOTILIDAD EN LAS CIANOBACTERIAS.....	167
15.1. El AMPc y el GTP revierten la inhibición del movimiento producida por inhibidores de la actina y miosina II	167
15.2. Análogos del GTP como GTP γ (s) y GDP β (s), modifican el efecto de los inhibidores blebistaina y faloidina	170

DISCUSIÓN	173
1. EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO LECTINA-LIGANDO ENTRE BIONTES DE LÍQUENES ES UNIVERSAL E INDEPENDIENTE A LA NATURALEZA DE LAS ESPECIES QUE LO CONFORMAN	175
2. LA LECTINA FÚNGICA ACTUA COMO QUIMIOATRAYENTE MOVILIZANDO LOS FOTOBIONTES DE <i>P. CANINA</i>	184
3. LA QUIOTAXIS DE NOSTOC HACIA LA LECTINA FÚNGICA REQUIERE LA PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO	188
4. LOS CIANOBIOTES <i>NOSTOC</i> DE <i>P. CANINA</i> PRESENTAN UN CITOESQUELETO DE ACTINA Y MIOSINA-II	192
5. RESUMEN DEL SISTEMA DE REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LOS CIANOBIOTES DE <i>P. CANINA</i>	197
CONCLUSIONES	205
BILIOGRAFIA	209

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplo de fotobiontes que pueden formar parte en la asociación líquénica. Algas verdes: (A) *Trebouxia*, (B) *Stichococcus*. Cianobacterias: (C) *Gloeocapsa*, (D) *Nostoc*, (E) *Chlorococcus*. 4
- Figura 2.** Fotografía de la estructura de talo (A) homómero, (B) heterómero (Aprile *et al.*, 2011). 5
- Figura 3.** Transferencia de carbón entre fotobionte y micobionte en (A) ficolíquenes (B) cianolíquenes (Adaptado de: Lawrey, 1984). 7
- Figura 4.** Ruta biosintética de metabolitos secundarios de líquenes (Adaptado de: Elix & Stocker- Wörgötter, 2008). 9
- Figura 5.** Hipótesis de reconocimiento-discriminación entre simbiontes líquénicos de la Prof. Margalith Galun, basada en sus propios trabajos con lectina ABP de *X. parietina*. 14
- Figura 6.** Reconocimiento de potenciales fotobiontes basado en lectinas producidas por el micobionte (Adaptado de: Vicente *et al.*, 2008). 17
- Figura 7.** Desarrollo del micobionte alrededor de células de *Trebouxia* (Tomado de: Ahmadjian & Jacobs, 1981). 21
- Figura 8.** El potencial micobionte produce y segrega una arginasa glicosilada. La lectina puede adherirse a un ligando de pared con actividad ureasa presente en las células del alga (Compatibilidad) y produce el reclutamiento de células algales, un paso clave en reconocimiento celular entre biontes. En ausencia del ligando (Discriminación) la lectina penetra en el interior del alga produciendo un aumento de los niveles de putrescina y activación de glucanasas que lleva finalmente a la muerte de la célula fotosintética. 23
- Figura 9.** Esquema del modelo de reconocimiento entre cianobacterias y micobiontes compatibles (Adaptado de: Rinkinen, 2002). 26
- Figura 10.** Lectina del cianolíquen *L. corniculatum* unida a *Trebouxia* (clorobionte de *E. prunastri*). (A) Fotobiontes de *E. prunastri* sin tratamiento. (B) Fotobiontes de *E. prunastri* después de una hora en contacto con lectina secretada y purificada de *L. corniculatum* unida previamente a un fluorocromo (Tomado de: Vivas *et al.*, 2010). 28
- Figura 11.** Modelo de poro complejo en *Phormidium uncinatum*. El complejo se extiende por toda la pared que consiste en una membrana externa y una capa de petidoglicanos. El movimiento direccional resulta de la producción de mucílago a partir de un conjunto de poros en un lado del tabique celular. (Adaptado de: Hoiczky & Baumeister, 1998). 32

Figura 12. Diagramas esquemáticos que muestran la matriz fibrilar de la pared celular de *Oscillatoria* spp. (A) la parte de filamento que muestra septos celulares células. Cada fibrilla traza una trayectoria helicoidal de 25-30 ° respecto al eje del filamento. (B) Las distorsiones de las fibrillas entre la membrana externa y peptidoglicano (no se muestran) podrían propagarse rítmicamente, como ondas que se mueven de un extremo del filamento al otro. Estas ondas se transmiten a través de la membrana externa (flechas pequeñas) y, por interacción con el sustrato, hacen que el filamento se mueva en la dirección opuesta (flechas grandes) (Adaptado de: Adams *et al.*, 1999). 33

Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión de secciones transversales de *Oscillatoria* sp. Las ondulaciones en la pared celular son causadas por la presencia de la capa fibrilar (F) entre el peptidoglicano (PG) y la membrana externa (ME) (Adaptado de: Adams *et al.*, 1999). 34

Figura 14. Árbol filogenético de las actinas homólogas bacterianas que se han identificado hasta la fecha sobre la base de homología de secuencia. Las subfamilias que se ha demostrado experimentalmente que son capaces de polimerizar son etiquetadas y coloreadas (Adaptado de: Derman *et al.*, 2009). 37

Figura 15. Micrografía de fibroblastos humanos donde la F-actina ha sido marcada con faloidina unida a un fluoróforo conocido como FITC o fluoresceína isotiocianoato (Adaptado de: Hillberg *et al.*, 2006). 39

Figura 16. Estructura de la actina-F (Holmes *et al.*, 1990), filamentos MreB (van den Ent *et al.*, 2001) de la bacteria *Termostoga maritima* y ParM (van den Ent *et al.*, 2002). ParM: ADP monómero en conformación cerrada y apo ParM monómero en conformación cerrada (Adaptado de: Shaevitz & Gitai, 2010). 41

Figura 17. Comparación estructural de actina bacteriana y de eucariotas. (a) MreB consiste en filamentos similares a una hebra (protofilamento) de actina-F. (Adaptado de: Löwe *et al.*, 2004). (b) Superposición de MreB de la bacteria *T. maritima* (azul) con actina de levadura (rosa). A pesar de tener una identidad de secuencia muy baja, las dos proteínas tienen esencialmente el mismo plegamiento con una identidad de secuencia de 16% (Adaptado de: Kruse & Grendes, 2005). 42

Figura 18. Modelo para la biosíntesis de la pared lateral en *B. subtilis*. Filamentos MreBs (rojo) y complejos de biosíntesis de peptidoglicanos (verde) implicados en la elongación de la pared lateral en la membrana (m), se mueven a lo largo de las pistas periféricas perpendiculares al eje longitudinal de la célula. Estos complejos de elongación son capaces de moverse en ambas direcciones (flechas). La inserción de bandas circunferenciales de nuevos peptidoglicanos (p, amarillo) aparece en el exterior de la membrana bajo las hebras antiguas (marrón). (Adaptado de: Chastanet & Carballido-Lopez, 2012). 44

Figura 19. Modelo del ciclo de la motilidad de la miosina del músculo (A): En el estado ADP-Pi-enlazado, el núcleo catalítico se une débilmente a la actina formando el complejo actomiosina (B): Las dos cabezas de miosina actúan de forma independiente, y sólo una se une a la actina a la vez. (C): El acoplamiento con la actina provoca la liberación de fosfato desde el sitio activo. (D): El ATP se une a la cabeza de la miosina y el complejo actomiosina se disocia (Vale & Milligan, 2000). 46

Figura 20. Micrografía de transmisión del citoesqueleto contráctil de <i>S. melliferum</i> BC3. Todos los componentes celulares han sido extraídos y sólo el citoesqueleto y los ribosomas fueron preservados. La trayectoria helicoidal del citoesqueleto es claramente visible en secciones transversales (puntas de flecha) y las secciones tangenciales (flechas) (Adaptado de: Trachtenberg, 1998).	47
Figura 21. Representación esquemática de la estructura tipo trinquete que participa en la motilidad de <i>Flavobacterium</i> y organismos relacionados. Las proteínas en la membrana citoplasmática (MC) impulsan a las proteínas de membrana externa (ME) a lo largo de unos "carriles" que están anclados a los petidoglicanos (PG). La fijación temporal de las proteínas de ME al sustrato produce el movimiento celular. (Adaptado de: McBride, 2001).	47
Figura 22. Ciclo de la GTPasas. La forma inactiva aparece unida a GDP mientras que la forma activa se está unida a GTP. En células mamíferas, su actividad está regulada por una gran familia de 85 GEFs (Guanine nucleotide Exchange factors) y más de 80 GAPs (GTPase activating proteins) y 3 GDIs (GDP- dissociation inhibitor). La GTPasa activa interactúa con proteínas efectoras para mediar la respuesta (Adaptado de: Jaffe & Hall, 2002).	52
Figura 23. Lugar de recolección y ejemplar del cianolíquen <i>Peltigera canina</i> (L.) Willd. ..	61
Figura 24. Esquema del aislamiento de cianobiontes a partir de talos de <i>P. canina</i>	62
Figura 25. Reacción citoquímica de la ureasa.	64
Figura 26. Aislamiento de arginasa por cromatografía de afinidad.	67
Figura 27. Valoración de la actividad arginasa mediante el método de Conway (1962). ..	68
Figura 28. Valoración de la actividad ureasa mediante el método de Conway (1962).	68
Figura 29. Molécula de isotiocianato de fluoresceína (ITFC).	73
Figura 30. Ensayos de ligamiento cruzado de lectina fúngica sobre fotobiontes, todos los tratamientos fueron analizados mediante microscopia de fluorescencia.	76
Figura 31. Experimento de quimiotaxis de los cianobiontes de <i>P. canina</i> hacia capilar conteniendo lectina fúngica.	82
Figura 32. Molécula de A-22 (S-(3,4-diclorobencil) isotiourea) (Santa Cruz Biotechnology).	85
Figura 33. Molécula de blebistatina (Sigma-Aldrich).	86

Figura 34. Molécula de faloidina procedente de la especie <i>Amanita phalloides</i> (Sigma Aldrich).	86
Figura 35. Molécula de latrunculina-A procedente de la especie <i>Negombata magnifica</i> (Sigma- Aldrich).	87
Figura 36. Molécula de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich).	92
Figura 37. Representación esquemática de la técnica de electroforesis bidimensional. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico. A continuación, las proteínas se separan en base a su masa molecular por electroforesis.	93
Figura 38. Molécula de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Sigma-Aldrich).	103
Figura 39. Molécula de guanosín trifosfato (GTP) (Sigma-Aldrich).	104
Figura 40. Cianobacterias <i>Nostoc</i> sp. aisladas a partir del cianolíquen <i>Peltigera canina</i>	109
Figura 41. Detección citoquímica de la ureasa de pared. (A) Cianobiontes <i>Nostoc</i> recientemente aislados de <i>P. canina</i> . (B) Cianobiontes incubados durante 2 horas en urea 40 mM, a continuación en CoCl_2 10 mM y después revelados con CoCO_3 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los depósitos negros se encuentran localizados en la pared celular (flechas rojas). (C) Cianobiontes tratados para la detección citoquímica sin incubar previamente con urea 40 mM.	110
Figura 42. Valoración de la concentración de proteína y de la actividad arginasa (1 unidad = $1 \mu\text{mol NH}_4^+ / \text{mg prot min}$) en las fracciones de elución de arginasa de <i>P. canina</i> sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa del líquen <i>E. prunastri</i> . La elución se llevó a cabo mediante (A) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y (B) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 onteniendo α -D- Galactosa 50 mM. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.	112
Figura 43. Tiempo de incubación para la extracción de ureasa, extraída a partir de células de <i>P. canina</i> , obtenidas a partir de talos flotando en tampón fosfato 50 mM, pH: 6,8, conteniendo 40 mM urea a 30°C en oscuridad. El valor obtenido es la media de 3 réplicas. Medida como actividad específica enzimática (1 unidad = $1 \mu\text{mol NH}_4^+ / \text{mg-prot-min}$). Las barras verticales representan el error estándar de las medias.	113
Figura 44. Valoración de la concentración de proteína y de la actividad ureasa (unidad = $1 \mu\text{mol NH}_4^+ / \text{mg-prot-min}$) en las fracciones de elución de la ureasa de <i>P. canina</i> sobre lechos de azarosa activada con bromuro de cianógeno con arginasa del mismo líquen. La elución se llevó a cabo mediante (A) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y mediante (B) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 conteniendo α -D- Galactosa 50mM. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.	115

Figura 45. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Nostoc* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D- Galactosa 50 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia. (E) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-manosa 50 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia. 117

Figura 46. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. (B) Fluorescencia relativa en el sobrenadante de fotobiontes de *P. canina* incubadas con arginasa segregable del mismo líquen y marcada con ITCF (tiempo cero) y fluorescencia relativa del sobrenadante después de incubar con el monosacárido galactosa y/o manosa (tiempo 1). 118

Figura 47. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Trebouxia* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Clorobiontes incubados con de arginasa de *P. canina* (1,5 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Clorobiontes incubados con arginasa de *P. canina* (1,5 μ g·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-Galactosa 100 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia. 119

Figura 48. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Nostoc* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Cianobiontes incubados con lectina de *E. prunastri* (1,5 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Cianobiontes incubados con arginasa de *P. canina* (1,5 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α - D-Galactosa 100 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia. 120

Figura 49. Medida de la emisión de la fluorescencia relativa en el sobrenadante de la incubación de fotobiontes de *P. canina* y *E. prunastri* con arginasa segregable marcada con ITCFC. I1 representa los valores de la primera incubación con arginasa marcada del líquen contrario e I2 incubados con arginasa del propio líquen. 121

Figura 50. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* (A) incubados con de arginasa de *E. prunastri* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (B) Clorobiontes incubados con α -1,4-galactosidasa (5 u de enzima/mL) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *E. prunastri* en las mismas condiciones. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* (C) incubados con de arginasa de *P. canina* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Clorobiontes incubados con α -1,4-galactosidasa (5 u de enzima/mL) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *P. canina* en las mismas condiciones. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* (E) incubados con de arginasa de *P. canina* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (F) Células *Nostoc* incubadas con α -1,4-galactosidasa (5 u de enzima/mL) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *P. canina* en las mismas condiciones. Fotobiontes de *P. canina* (G) incubados con de arginasa de *E. prunastri* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (H) Cianobiontes incubados con α -1,4-galactosidasa (5 u de enzima/mL) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *E. prunastri* en las mismas condiciones. 124

Figura 51. (A) Gel de la electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones de la cromatografía de afinidad. Cale 1: BSA. Calle 2: marcador molecular. Calle 3: Medio de incubación de *Evernia* sin pasar por columna. Calle 4: Fracción 7 de *Evernia* eluida con Galactosa 50 mM. Calle 5: Medio de incubación de *Peltigera* sin pasar por columna. Calle 6: Fracción 7 de *Peltigera* eluida con Galactosa 50 mM. (B) Valoración de la concentración de proteína y de la actividad arginasa en las fracciones de elución de la arginasa de *P. canina* y (C) *E. prunastri* sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa de *E. prunastri* adsorbida. 126

Figura 52. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal. 127

Figura 53. Talo de *P. canina* realizadas mediante microscopía óptica de campo claro y microscopía de fluorescencia. (A) Sección transversal de talo heterómero de *P. canina*. (B) Sección transversal de talo bajo luz azul mostrando la autofluorescencia roja de las clorofilas excitadas de células *Nostoc* sp. 128

Figura 54. Máxima eficiencia fotoquímica del fotosistema II en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h. 128

Figura 55. Cantidad de clorofila a extraída mediante el método de extracción con DMSO en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h. 129

Figura 56. Cantidad de malondialdehído presente en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h. 130

Figura 57. Actividad específica de la ezmina β -1,4-glucanasa presente en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h. 131

Figura 58. Curso temporal de la movilidad celular de cianobiontes de *P. canina* hacia lectina purificada ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir del mismo líquen y hacia tampón de extracción como control, estimado como el número de células que entran en un capilar a distintos periodos de tiempo. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 132

Figura 59. Curva dosis-respuesta de movilidad de *Nostoc* sp. después de 8 h de incubación frente a concentraciones variables de lectina fúngica purificada a partir de *P. canina*. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 133

Figura 60. Cianobiontes de *P. canina* (A y B) recogidos del interior de capilares en los que se introdujo $20\text{ }\mu\text{L}$ de lectina fúngica con una concentración de $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cianobiontes (C y D) que no se han desplazado hacia el capilar, es decir, presentes en la placa Petri. .. 134

Figura 61. Cianobiontes de *P. canina* (A) que no se han desplazado hacia el capilar, es decir, presentes en la placa Petri. Cianobiontes (B) recogidos del interior de capilares en los que se introdujo 20 μL de lectina fúngica marcada con ITCF con una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 135

Figura 62. Cianobiontes recogidos del interior de capilares en los que se introdujo 20 μL de lectina fúngica con una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en función del tipo de luz radiada. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 136

Figura 63. Micrografías de barrido de cianobiontes *Nostoc* de *P. canina* después de 4 h en contacto con un capilar con 20 ng de lectina aislada a partir del mismo líquen e incubadas a 4 mm del capilar en tampón de extracción. (A-B) Células *Nostoc* que no se han desplazado hacia la lectina. Las micrografías revelan una ausencia de orgánulos periféricos en todos los casos, así como la presencia de pequeñas espículas sobre la superficie invaginada. (C-D-E) Cianobiontes presentes en el interior del capilar, agrupados formando filamentos incipientes y cubiertos de una sustancia mucilaginosa. 138

Figura 64. Micrografía de barrido de *Nostoc* después de 4 h en contacto con un capilar con 20 μg de lectina aislada a partir del mismo líquen e incubadas a 4 mm del capilar en tampón de extracción. La figura presenta una de las células no desplazadas al interior del capilar, es una muestra representativa de la forma de los cianobiontes que no se han movilizado hacia la lectina fúngica. 139

Figura 65. Micrografías de transmisión de cianobiontes aislados de *P. canina* mostrando a diferentes aumentos una compleja capa externa con subestructura serrada (CS), espacio periplasmático y péptidoglicanos (P), membrana plasmática (MP). En el interior celular aparecen: tilacoides (T), regiones de ADN (RA), citoplasma (C), cuerpos proteicos (CP) y ribosomas (R). 140

Figura 66. Efecto del inhibidor A-22 en la movilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 μL de lectina fúngica (0,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtenida a partir del mismo líquen. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 141

Figura 67. Micrografía de fluorescencia de células *Nostoc* presentes en el interior un capilar conteniendo 20 ng de lectina (0,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en presencia de A-22 20 μM y revelados con faloidina-ITCF. 142

Figura 68. Efecto de inhibidores del citoesqueleto sobre la movilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina fúngica obtenida a partir del mismo líquen. (A) Efecto de la blebistatina sobre la motilidad celular a distintas concentraciones (10 y 25 μM) en términos de número de células *Nostoc* en el interior del capilar, conteniendo la lectina en su interior. (B) Efecto de la faloidina sobre la motilidad celular distintas concentraciones, en términos de número de células *Nostoc* en el interior del capilar, conteniendo la lectina en su interior. (C) Efecto conjunto de la blebistatina (25 μM) de la faloidina (0,2 μM). (D) El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 144

Figura 69. Efecto de Latrunculina-A 10 μM en la motilidad de los cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina fúngica obtenida a partir del mismo liquen. Efecto conjunto de latrunculina-A 10 μM y blebistatina 25 μM . El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 145

Figura 70. Micrografías de fluorescencia de células *Nostoc* presentes en el interior un capilar conteniendo 20 ng de lectina incubadas en ausencia de inhibidores y (A) posteriormente marcadas con faloidina-ITCF. (B) Cianobiontes incubados en presencia de blebistatina 25 μM , (C) faloidina 0,19 μM y blebistatina 25 μM . Las flechas blancas indican el inicio de la agregación celular. Las flechas rojas indican puntos de probable despolimerización de F-actina, por una ausencia de fluorescencia detectada en esa zona. 147

Figura 71. Micrografía confocal de cianobacterias recogidas de un capilar conteniendo 20 mg de lectina (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y posteriormente marcadas con faloidina-ITCF. Las cinco zonas seleccionadas son las denominadas ROI (region of interest) utilizadas para la cuantificación de la fluorescencia. 149

Figura 72. Medida de la intensidad de fluorescencia máxima, mínima y media emitida por pixel en cianobacterias de *P. canina* incubadas durante 4 h con distintos inhibidores según tratamiento. 150

Figura 73. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con (A) anti- α -actina, (B) anti- β -actina. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 37, 50 KDa). Se observan en verde, las bandas correspondientes a la actina de cianobacterias C10, C20, C40, utilizando 10, 20 y 40 μg de extracto proteico, respectivamente. Control: CEF= células embrionarias de fibroblastos de ratón de 10,5 días. 152

Figura 74. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina*, separado por electroforesis 2D en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. (A) Membrana incubada con anti- α -actina. (B) Membrana incubada con anti- β -actina. (C) Gel revelado con azul de coomasie. En rojo se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 50 KDa). Se utilizan 100 μg de extracto proteico en todos los casos menos en el control positivo. 154

Figura 75. Micrografías de transmisión de células *Nostoc* aisladas a partir de talos de *P. canina* e incubadas con anti- β -actina unida a ferritina. (A) Cianobiontes no expuestos al anticuerpo unido a la actina ni a la lectina fúngica. (B) Cianobiontes previamente incubados con 20 ng de lectina fúngica durante 4 h. (C) Células *Nostoc* incubadas previamente con 20 ng de lectina fúngica durante 4 h, incluyendo latrunculina-A 10 μM en la mezcla. ... 156

Figura 76. Detalle de micrografía de transmisión de una cianobacteria *Nostoc* aislada a partir de talos de *P. canina* e incubadas con anti- β -actina unida a ferritina. Las flechas rojas señalan la zona de unión entre los filamentos de actina polimerizada y la membrana plasmática. 157

Figura 77. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* control (no expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen). La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular. 158

Figura 78. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen. La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular. La fotografía K es el resultado de la proyección en 2D del total de imágenes obtenidas. 159

Figura 79. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* control expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen y a latrunculina A 10 μ M. La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular. 160

Figura 80. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del líquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con anti-cadena pesada de miosina II-A y II-B. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 180, 135, 100 KDa). La calle correspondientes a la actina de cianobacterias es C60, utilizando 60 μ g de extracto proteico, en ambos casos Control: CHO= células de ovario de hámster chino. 162

Figura 81. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del líquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con: anti-cadena ligera de miosina, anti-cadena ligera de miosina fosforilada en serina 19 y serina 19 y triptófano 18. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 20, 25, y 48 KDa). Se observan, las bandas correspondientes a la actina de cianobacterias C60, utilizando 60 μ g de extracto proteico, respectivamente. Control: CHO= células de ovario de hámster chino. 164

Figura 82. (A) Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del líquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Los cianobiontes fueron previamente incubados en presencia de lectina fúngica (0, 20, 50 y 225 min). Las membranas fueron incubadas con: anti-cadena ligera de miosina fosforilada en serina 19 Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 20, 25, y 48 KDa). Se observan, las bandas correspondientes a la miosina de cianobacterias, utilizando 60 μ g de extracto proteico, respectivamente. Control: CHO= células de ovario de hámster chino. (B) Densidad relativa de las bandas, el valor obtenido para cada tiempo de incubación es la relación de dicho valor. 166

Figura 83. Efecto del AMPc en la motilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio líquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores y AMPc. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias. 168

Figura 84. Efecto del GTP en la motilidad de cianobiontes de <i>P. canina</i> hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio liquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores y GTP. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.	168
Figura 85. Efecto del GTP, GTP γ (s) y GDP β (s) en la motilidad de cianobiontes de <i>P. canina</i> hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio liquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores, GTP GTP γ (s) y GDP β (s). Los valores obtenidos fueron representados como la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.....	171
Figura 86. Reconocimiento de la lectina fúngica con actividad arginasa por parte del fotobionte compatible. (A) Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel celular del clorobionte de <i>E. prunastri</i> . (B) Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel celular del cianobionte de <i>P. canina</i>	180
Figura 87. Esquema teórico del movimiento de los cianobiontes de <i>P. canina</i> hacia un gradiente de lectina fúngica. La primera unión de la lectina a sus receptores de pared induce la invaginación polarizada de las células, producido por la interacción de una ATPasa con capacidad contráctil, sensible a blebistatina, con F-actina del citoesqueleto. A continuación, la despolimerización de actina-F en el polo opuesto y la consiguiente re-polimerización produce el avance de las células.	193
Figura 88. Esquema teórico de la regulación del desplazamiento producido por el citoesqueleto en los cianobiontes de <i>P. canina</i>	202
Figura 89. Esquema integrativo de la interacción lectina-ligando y el mecanismo de transducción de señal que produce la reorganización de citoesqueleto necesario para el desplazamiento y mantenimiento de la forma en los cianobiontes de <i>P. canina</i>	203

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Isoformas de arginasa secretada y purificada a partir del líquen <i>E. prunastri</i> . (a): estimado por electroenfoque en columna, (b): derivado de la ecuación de Hill (Adaptado de: Planelles & Legaz, 1987; Pedrosa & Legaz, 1995; Molina <i>et al.</i> , 1997).	13
Tabla II. Valoración de la actividad específica de la enzima ureasa, después de incubar talos de <i>P. canina</i> en tampón fosfato 50mM, pH: 6,8 con urea 40 mM durante 0, 2, 4 y 6 h. La concentración en mg·mL ⁻¹ se analizó mediante el método de Warburg & Christian y la actividad específica fue determinada mediante el método Conway utilizando el reactivo de Nessler (1unidad = 1 µmol NH ₄ ⁺ / mg·prot·min). El valor obtenido es la media de 3 réplicas.	113
Tabla III. Resumen del número de células con fluorescencia por la incubación de los fotobiontes de <i>P. canina</i> y <i>E. prunastri</i> con arginasa segregable marcada con ITCF así como en presencia de α- galactosidasa.	122
Tabla IV. µmoles de galactosa/ gpf de Galactosa por gramo de peso fresco de fotobionte en el sobrenadante, después de incubar las células durante 2 h con α-galactosidasa.	125
Tabla V. Ratio entre clorofila a y feofitinas en talos de <i>P. canina</i> incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.	129
Tabla VI. Resumen del número de células con fluorescencia asimétricamente distribuida respecto al número total de células en el interior de un capilar, conteniendo 20 ng de lectina. Las células fueron incubadas en ausencia de inhibidores, con blebistatina 25 µM y/o con faloidina 0,19 µM y blebistatina 25 µM y posteriormente marcadas con faloidina-ITCF.	148

INTRODUCCION

1. ASPECTOS GENERALES

Los líquenes son asociaciones simbióticas específicas íntimas, establecidas a largo plazo entre un hongo heterótrofo y una alga o una cianobacteria que se unen para formar una nueva entidad biológica diferente de sus componentes individuales (Galun & Kardish, 1995).

Han sido utilizados a lo largo de la Historia como alimento o con propósitos medicinales e industriales (Richardson, 1988, Lee & Kim, 2000; Muller, 2001; Kim & Lee, 2006). Unas 1.900 toneladas de líquenes son utilizadas por año como fijadores de perfumes, así mismo, productos derivados del metabolismo como el ácido úsnico son conservantes de cremas cosméticas y bronceadores (Seifert & Bertram, 1995). En muchos países se utilizan líquenes para monitorizar los efectos causados por contaminación gaseosa y metales. Hoy en día se les reconoce como bioindicadores de contaminantes y daños al medio ambiente en zonas templadas (Hawksworth *et al.*, 2005).

Estos organismos son capaces de colonizar todo tipo de ambientes y aparecen en los lugares más extremos (Sancho *et al.*, 2011) debido a su capacidad de permanecer en estado metabólicamente inactivo durante largos períodos de tiempo (Sancho, 2011). Sin embargo, actualmente están siendo gravemente afectados por la actividad humana. Desde el Siglo XX, la tala, la minería, la agricultura, la expansión suburbana y a largo plazo la contaminación del aire, están afectando a la diversidad y abundancia de líquenes en muchas regiones del mundo (Wolseley 1995). La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sugieren que no todas las especies de líquenes son igualmente vulnerables a la actividad humana, siendo los cianolíquenes un grupo especialmente sensible a los cambios del medio ambiente (Goward & Arsenault, 2000).

1.1. Componentes de la simbiosis líquénica

La asociación líquénica representa uno de los estilos de vida más exitosos entre los hongos. El 20% de todas las especies de hongos descritas forman líquenes, porcentaje superior o igual a los que forman asociaciones parasitarias (20%) o asociaciones micorrizas (8%), solo superado por los hongos descomponedores sapróbios (50%) (DePriest, 2004). Taxonomicamente, son clasificados según el hongo que forma la simbiosis y actualmente se estima que el número de especies presentes en el planeta se encuentra alrededor de 20.000 (Kirk *et al.*, 2008) donde al menos dos quintas partes de las especies conocidas son hongos liquenizados de la clase *Ascomycota* (Ahmadjian, 1993). De todos los órdenes conocidos,

dieciséis forman líquenes y entre ellos sólo seis forman únicamente líquenes, es decir, no aparecen en la naturaleza como hongos de vida libre (Mehrotra & Aneja, 1990). La dotación cromosómica haploide oscila entre $n=2$, en *Peltigera*, hasta $n=8$ en *Dermatocarpon*. Las mutaciones somáticas son frecuentes y dependen de la edad, pues se ha demostrado que los grandes talos pueden ser un mosaico de diferentes isoenzimas y genotipos (Barrero & Ortega, 2003).

Se estima que unas 150 especies de algas (Voytsekhovich *et al.*, 2011), distribuidas en 40 géneros, pueden formar parte de una asociación liquénica. Todas ellas se clasifican en al menos 5 clases filogenéticamente divergentes: *Cyanophyceae*, *Tribophyceae* (*Xanthophyceae*), *Fucophyceae* (*Phaeophyceae*), *Chlorophyceae*, y *Trebouxiophyceae* (Friedl & Budel, 1996), donde la liquenización ha surgido independientemente en cada uno de los grupos no relacionados (DePriest, 2004) (Figura 1).

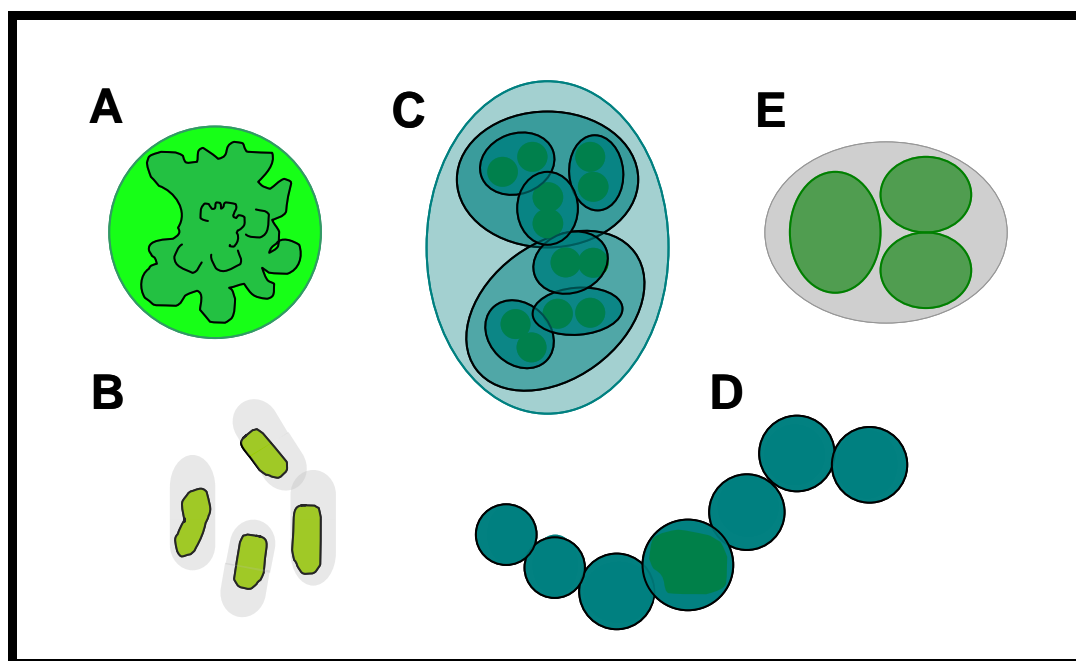


Figura 1. Ejemplo de fotobiontes que pueden formar parte en la asociación liquénica. Algas verdes: (A) *Trebouxia*, (B) *Stichococcus*. Cianobacterias: (C) *Gloeocapsa*, (D) *Nostoc*, (E) *Chlorococcus*.

Aproximadamente una quinta parte de toda especies conocidas de hongos existentes forman relaciones simbióticas con las algas verdes, cianobacterias o en algunos casos con ambos fotobiontes (Lutzoni *et al.*, 2001). El fotobionte más común de todos ellos es el alga verde unicelular *Trebouxia* (Ahmadjian, 1993) y sólo un 13% del total de especies conocidas presentan una cianobacteria como fotobionte, siendo *Nostoc* el género de mayor frecuencia (Büdel, 1992; Rikkinen, 2002).

1.2. El talo liquénico

Los talos liquénicos son sistemas emergentes que generan una variedad de estructuras vegetativas, formas de crecimiento, reproducción y biotipos especiales. Actualmente, la anatomía y morfología de los líquenes se interpretan como la expresión de finas adaptaciones a las características ecofisiológicas de las simbiosis, donde el mayor grado de complejidad se alcanza en los biotipos foliáceos y fruticulosos. La anatomía de los talos puede resumirse en dos grandes tipos (Figura 2). Los talos homómeros se caracterizan porque el micobionte y el fotobionte están uniformemente distribuidos, siendo esto muy frecuente en líquenes de los géneros *Leptogium* o *Collema*. Sin embargo, la mayor parte de los líquenes desarrollan talos estratificados internamente denominados heterómeros. En estos casos el fotobionte suele estar protegido por una capa fúngica de grosor variable o córtex. Esta capa, de anatomía y número variable, puede presentar algunas sustancias como el ácido úsnico, atranorina o parietina, depositadas para proteger el aparato fotosintético del fotobionte de un exceso de radiación (Barrero & Ortega, 2003).

Debajo del córtex se sitúa la médula, una capa donde predomina el fotobionte y se establecen los contactos físicos entre biontes. Está formada por un conjunto de hifas laxamente mezcladas que se disponen de tal manera que las algas pueden captar la luz solar para fotosintetizar (Ahmadjian, 1993). La médula es hidrófoba, de modo que incluso en épocas de lluvia el interior del talo puede permanecer seco, permitiendo así la circulación del aire. Los talos pueden soportar de forma repetida períodos de humedad y desecación sin que se desnaturalicen las proteínas de membrana de los simbiontes o sin fallos en el funcionamiento de los cloroplastos (Barrero & Ortega, 2003).

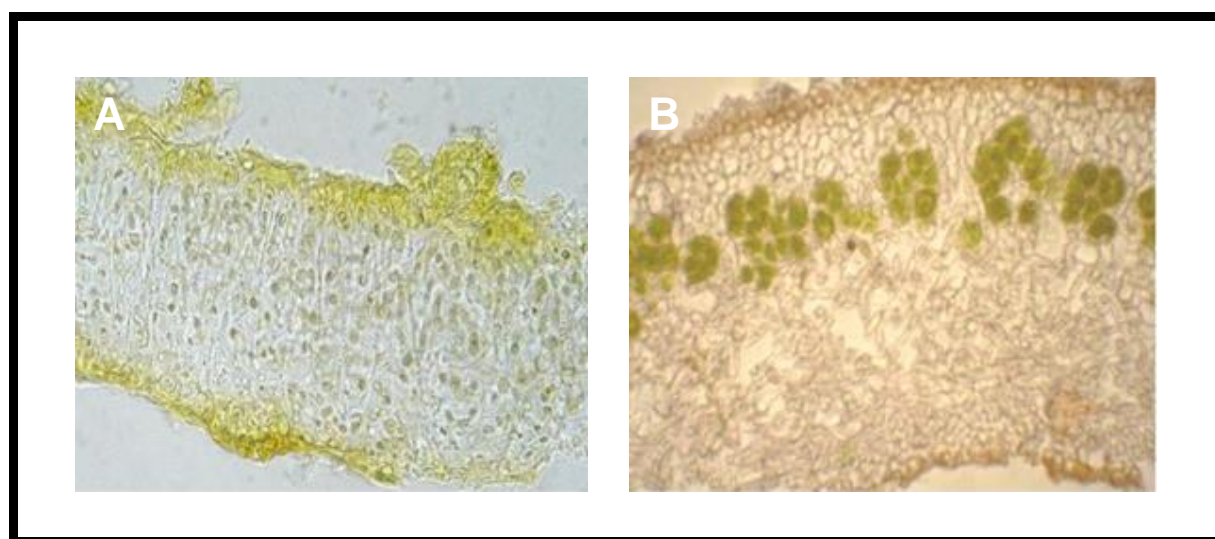


Figura 2. Fotografía de la estructura de talo (A) homómero, (B) heterómero (Aprile *et al.*, 2011).

1.3. Interacción entre biontes

Desde el momento en que se propuso por primera vez que los líquenes eran organismos duales (Schwendener, 1869), se ha planteado una fuerte controversia, que se ha mantenido a lo largo de la historia de la Lichenología, acerca de si la asociación liquénica se puede considerar mutualista o si es un parasitismo. Los líquenes son considerados como un tipo de simbiosis mutualista, en el que la capacidad de la supervivencia de ambas partes resulta favorecida a causa del estado simbiótico (Smith & Douglas, 1987). Sin embargo, algunos autores han considerado que la simbiosis liquénica es un parasitismo controlado, y no una relación mutualista, donde el micobionte ejerce un control sobre la población de algas o cianobacterias que forman el fotobionte (Ahmadjian & Jacobs; 1981; Lücking *et al.* 2009; Wooldridge, 2010). Ya sea clasificado como un mutualismo o parasitismo controlado, esta asociación es estable y autosuficiente (DePriest, 2004) ya que es notorio que cuando están juntos, ambos biontes pueden colonizar áreas que están fuera de la gama ecológica de cualquiera de los socios (Richardson, 1999).

La relación hongo-fotobionte en este tipo de organismos es de tipo ectotrófica (Galun & Bubrick, 1984). El contacto físico entre los simbiontes a menudo se lleva a cabo mediante el recubrimiento estrecho de la hifa sobre el ficobionte o por unas prolongaciones intraparietales denominadas haustorios (Honneger, 1984). Los elementos fúngicos implicados en la formación de haustorios son hifas aéreas que emergen procedentes de la célula interna del talo (Brown *et al.*, 1987) aunque cuando ocurre, el porcentaje de células invadidas no es muy elevado (Collins & Farrar, 1978). Su papel, desconocido hasta la fecha, podría ser exclusivamente el de un relicto de un pasado decididamente parasitario (Legaz *et al.*, 2006). En muchos líquenes el hongo no penetra la célula algal aunque se encuentra estrechamente adherido a ella. Las hifas desarrollan superficies de contacto variadas que pueden ensancharse en forma de discos donde las paredes de cada simbionte son tan delgadas que permiten el paso de los nutrientes. Estos filamentos fúngicos son llamados filamentos de retención (Chaparro & Aguirre, 2002). En el caso de los cianolíquenes, las hifas producen una hendidura sobre la pared de la cianobacteria causando una invaginación aunque las paredes de ambos simbiontes permanecen intactas (Galun & Bubrick, 1984).

El sistema de intercambio de metabolitos se realiza directamente desde los espacios intercelulares, por difusión pasiva o facilitada, o por transporte activo mediante fosforilación-desfosforilación acoplado a la enzima adenilato ciclasa para los azúcares (Legaz *et al.*, 2006). El hongo, protege al alga contra la desecación (Nimis & Skert, 1999) o el calor solar produciendo pigmentos en los tejidos corticales, así mismo proporciona gas carbónico para

su respiración y da forma al líquen (en la mayoría de los casos). Sin embargo la forma del talo liquénico no es la misma que la del hongo aislado. Este hecho presupone que el alga también contribuye, en alguna proporción, al establecimiento de la forma y estructura del líquen (Chaparro & Aguirre, 2002). Sea cual sea la forma de crecimiento de un líquen, éste funciona como un sistema que produce la fotosíntesis neta necesaria para que su talo pueda crecer. Esto implica que el fotobionte debe recibir la cantidad de luz suficiente. En condiciones de iluminación excesiva, el mecanismo de protección más utilizado, es la desecación del talo para proteger el aparato fotosintético, estrategia especialmente común en los líquenes de zonas áridas. La captación del agua puede ser absorción de ésta del vapor de agua de la atmósfera o en forma líquida. Las algas verdes son capaces de hidratarse hasta la saturación y alcanzar una fotosíntesis neta positiva, a humedad relativa del aire superior a 85%, sin embargo, los líquenes con cianobacterias necesitan la presencia de agua líquida para alcanzar el mismo rendimiento, relacionado también con la necesaria falta de oxígeno para la fijación del N atmosférico (Barrero & Perez, 2003).

En el entorno liquénico, el hongo es incapaz de obtener hidratos de carbono de otra fuente que no sea el alga (Hill, 1980). Por ello, el alga produce un exceso de carbohidratos, normalmente azúcares, los cuales son utilizados por el micobionte y almacenados en forma de manitol, forma no disponible para el fotobionte. Aunque el tipo de azúcar es determinado por el alga (Galun & Bubrick, 1984), siendo ribitol, sorbitol o eritritol en líquenes que contienen un alga verde como fotobionte y glucosa en cianolíquenes (Figura 3).

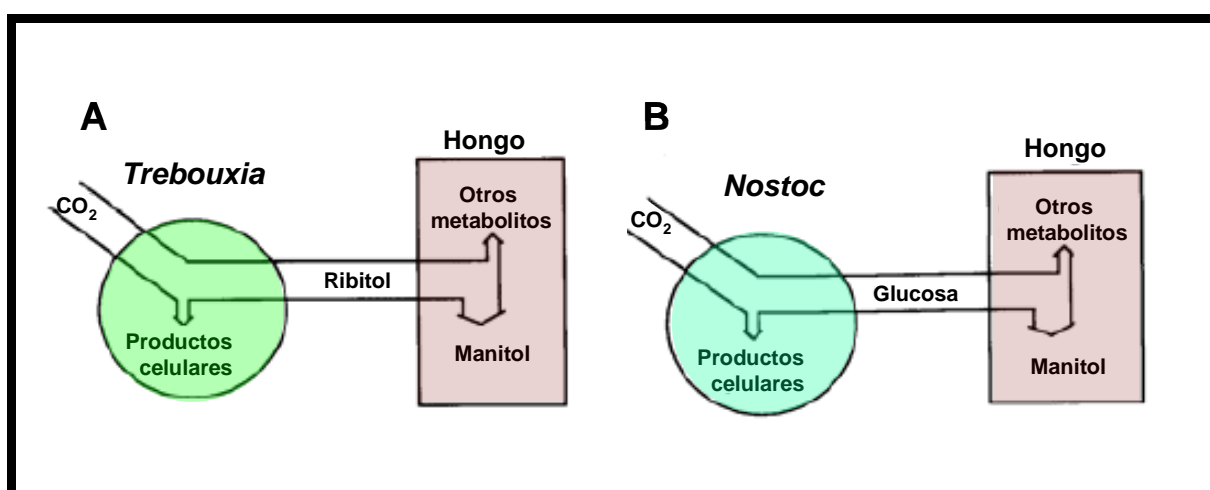


Figura 3. Transferencia de carbón entre fotobionte y micobionte en (A) ficolíquenes (B) cianolíquenes (Adaptado de: Lawrey, 1984).

Los líquenes no se reproducen sexualmente como un organismo completo, el hongo mantiene su reproducción agámica, mientras que el alga sólo se propaga por escisión y

pierde su capacidad para producir zoosporas (Hawksworth, 1988; Ahmadjian 1993). De este modo la única fuente de variabilidad genética en los fotobiontes ha quedado reducida a la mutación y la capacidad de ocupar otro hábitat es muy pequeña (Czezuga & Czezuga-Sumenik, 2002). Sin embargo, en asociación líquénica el fotobionte puede cambiar la intensidad del color, forma, tamaño o cubiertas. Un ejemplo de estos cambios se puede observar en las cianobacterias del género *Nostoc*, la cual es ubicada en la familia *Collemaaceae*, mientras que en especies como *Peltigeraceae* o *Lobariaceae*, las cadenas de la cianobacteria se disocian o forman filamentos celulares cortos, formando racimos, dando la apariencia del grupo de las *Chroococcales* (Chaparro & Aguirre, 2002).

Algunos líquenes son capaces de captar nitrógeno de la atmósfera a partir de sus fotobiontes, los cianolíquenes tienen de media un mayor contenido de nitrógeno que otros líquenes (Hitch & Stewart, 1973). El sistema enzimático responsable de la fijación del nitrógeno atmosférico es una nitrogenasa, por lo general mucho más activa en la parte central del talo que en las zonas apical y basal (Legaz *et al.*, 2006). En ecosistemas desérticos, la captación de nitrógeno por cianolíquenes junto con la de cianobacterias se considera la fuente principal de este elemento (Evans & Ehleringer, 1993), especialmente en regiones donde el aporte de N es bajo.

1.4. Síntesis de compuestos secundarios

A semejanza de otros organismos los líquenes producen metabolitos primarios y secundarios. Siendo el talo líquénico una estructura compuesta, algunos productos son sintetizados por el hongo y otros por el fotobionte por lo que muchas veces no es posible determinar la contribución de cada componente. Los líquenes producen sustancias intracelulares (carbohidratos, carotenoides, aminoácidos de vida libre y vitaminas) las cuáles aparecen ligadas a la pared celular y el protoplasto. Estos compuestos ocurren aparecen también en hongos y algas de vida libre así como plantas superiores (Kika, 2006).

Sin embargo, los líquenes producen una gran cantidad de metabolitos secundarios o compuestos extracelulares, la mayoría de los cuales están exclusivamente presentes en líquenes (Hauck & Huneck, 2007). Son sintetizados por el micobionte (Elix, 1996) y acumulados en forma de pequeños cristales en la superficies exteriores de las hifas. Aproximadamente se han identificado hasta un total de 1050 compuestos secundarios (Stocker-Wörgötter, 2008), clasificados de acuerdo a su origen biosintético y características químicas (Culbertson & Elix, 1989). Es interesante que las cantidades de estas sustancias

líquénicas casi pueden alcanzar hasta el 30% del peso seco de los talos de líquen en algunas especies (Bačkorová *et al.*, 2012).

Las sustancias líquénicas tienen muchas funciones, principalmente actividades antimicrobianas, anti herbívoras, alelopáticas (Lawrey, 1986; Fashelt, 1994), incluso como agentes anticancerígenos (Haraldsdóttir *et al.* 2004; Días & Urban, 2009; Ren *et al.*, 2009; Bačkorová *et al.*, 2011; Bačkorová *et al.*, 2012)

La mayoría de los metabolitos secundarios son derivados del acetil-polimalonil, (Figura 4) (Molnár & Farkas, 2010), esta vía conduce a la formación de compuestos alifáticos tales como ácidos grasos de cadena larga y sustancias aromáticas como los ácidos fenólicos (Kika & Wagner, 1998). Los fenoles son compuestos formados por dos o tres anillos fenólicos enlazados por oxidaciones y uniones éster. Se denomina fenoles liquénicos a aquellos que son sustancias propias de líquenes (Legaz *et al.*, 2006), excluyendo a los fenoles producidos por hongos de vida libre u otros vegetales (Shibata, 1976).

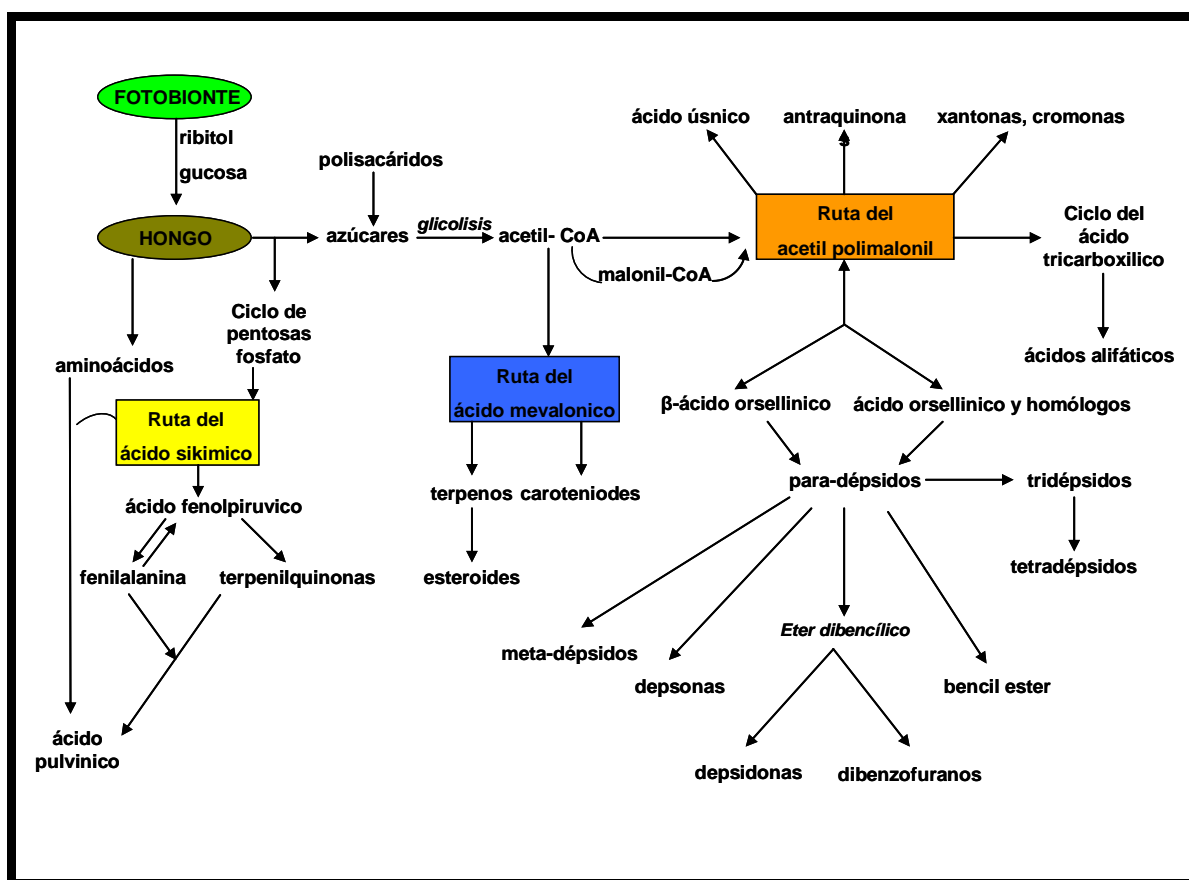


Figura 4. Ruta biosintética de metabolitos secundarios de líquenes (Adaptado de: Elix & Stocker-Wörgötter, 2008).

Los fenoles de líquenes son usualmente utilizados como filtros solares ya que las intensidades luminosas muy altas pueden causar fotoblanqueo de las algas por foto-oxidación de clorofilas (Millanes & Vicente, 2006). Metabolitos secundarios tales como atranorina, ácido úsnico, calicina, ácido rizocárpico, cristalizan en el córtex superior aumentando la opacidad de la corteza (Molnár & Farkas, 2010), de modo que se crea una pantalla protectora (Rundel, 1978) contra el exceso de rayos UV.

También pueden actuar como agentes ficocidas gracias a su capacidad para inactivar proteínas enzimáticas (Cochietto *et al.*, 2002; Vicente & Legaz, 1998) e inhibir tanto la respiración como la fotosíntesis (Vavasseur *et al.*, 1991). A través de estos fenoles, el hongo puede regular el tamaño de la población del ficobionte dentro del talo (Honegger, 1987).

1.5. Metabolismo de la urea en líquenes

La urea es el producto final de una de las distintas vías de catabolismo de la arginina (Legaz *et al.*, 2006) e hidrolizada por ureasa, produciendo amonio y dióxido de carbono (Blanco *et al.*, 1984). Los líquenes pueden ser divididos en dos categorías con respecto a su capacidad para producir urea:

- i) Cianolíquenes que producen ureasa cuya actividad permanece constante y no incrementa cuando se administra urea exógena a los talos. *Peltigera aphtosa* e *P. canina* mantienen los niveles de actividad de ureasa incluso cuando otras fuentes externas de nitrógeno como nitrito o amonio son incluidas en el medio de cultivo (Brown *et al.*, 1982; Legaz, 1985).
- ii) Líquenes que contienen algas verdes y sintetizan ureasa como respuesta a la adición de urea exógena (Legaz & Brown, 1983) así como por rehidratación del talo (Rodríguez & Vicente, 1991).

La enzima ureasa es sintetizada por ambos biontes liquenizados y por los hongos y algas de vida libre. Por ejemplo, el micobionte de *Cladonia verticilaris* retiene aproximadamente un 25% del total de actividad ureasa presente en el talo, en cuanto que el micobionte de *Parmelia roystonea* retiene el 54%. No obstante, en *Evernia prunastri*, así como *Cladonia dendroides*, está prácticamente localizada en el fotobionte (Legaz *et al.*, 2006). La hidrólisis de la urea produce dióxido de carbono que puede ser usado para la producción de fenoles líquénicos (Blanco *et al.*, 1984). Estos fenoles inhiben la urea

mediante el bloqueo de sus grupos tiol activos (Vicente *et al.*, 1978) y numerosos datos experimentales sugieren que la inhibición por fenoles puede ser considerada como un sistema de regulación *in vivo*. (Vicente *et al.* 1983; Legaz & Vicente, 1989; Choudhary *et al.*, 2011). Los fenoles, cristalizan sobre las paredes del fotobionte o penetran en el citoplasma por un proceso de difusión facilitada, ejerciendo sobre la célula un efecto ficocida (Legaz *et al.*, 2006). No en el caso de los cianolíquenes, para los que la ureasa es una enzima constitutiva. *Peltigera canina* presenta actividad ureasa antes de la incubación con urea exógena en condiciones de laboratorio, sin embargo, la actividad disminuye rápidamente cuando la incubación se realiza en oscuridad.

2. DETERMINANTES MOLECULARES DEL RECONOCIMIENTO ENTRE BIONTES

Los líquenes son organismos simbióticos en los que uno o ambos simbiontes son obligados, específicos y especializados. Ambos biontes aparecen en la naturaleza entre una mezcla de millones de microorganismos no simbióticos y requieren mecanismos de combinación compatible para formar una asociación (Galun & Kardish, 1995). Por ello se requiere una especificidad suficiente para que dicha asociación se establezca. En este contexto, se puede definir la especificidad como la asociación preferente, aunque no exclusiva, de un bionte con otro (Bubrick, 1988).

Se ha observado anteriormente (Ott, 1987), que el micobionte se asocia libremente con otros fotobiontes hasta encontrar el alga apropiada para formar un talo típico. Si dichas algas localmente óptimas son parte de un líquen preexistente o representan algas de vida libre es un tema de debate, ya que los líquenes no presentan estructuras desarrolladas para la propagación de las algas en solitario (Wornik & Grube, 2010).

Las evidencias de la existencia de algas de vida libre en el género *Trebouxia* aumentan (Schroeter & Sancho, 1996; Sanders, 2005; Capitelli *et al.*, 2007) pero aparentemente no forman colonias grandes y son probablemente de vida efímera. Una fuente de algas podrían ser líquenes que han experimentado un gran aumento de la humedad durante un tiempo prolongado, por ejemplo, por un cierre de vegetación en los bosques. Bajo tales situaciones, las colonias de algas pueden crecer fuera de los talos de líquenes, sin embargo, la dispersión de los tales colonias de algas aún no se ha estudiado en detalle (Wornik & Grube, 2010).

Cuando las células del alga o cianobacteria proliferan dentro de un talo líquénico en crecimiento, las células hijas están envueltas por hifas fúngicas que deben reconocer las nuevas células del alga como compatibles (Ahmadjian, 1993). Estudios ultraestructurales y de resíntesis han intentado dilucidar la relación entre los simbiontes de un líquen en el talo, sugiriendo que tal relación debe envolver factores de reconocimiento en la superficie celular (Ahmadjian *et al.*, 1978).

2.1. Lectinas líquénicas: glicoproteínas producidas por el micobionte

Las lectinas constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas de amplia distribución y de origen no inmune, con sitios de unión de naturaleza no catalítica capaces de reconocer y unirse reversiblemente a azúcares específicos (Kennedy *et al.*, 1995; Correia *et al.*, 2008). Están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos o no uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares como: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (Perez, 1999).

La participación de las lectinas como posibles mediadores de la simbiosis de líquenes formados a partir de hongos ascomicetos, ha sido un tema de interés permanente entre los liquenólogos (Howe & Barret, 1970; Galun *et al.*, 1976). Los estudios de reconocimiento usando líquenes como material biológico, muestran que dichas glicoproteínas están involucradas en mecanismos de reconocimiento (Lockhart *et al.*, 1978; Bubrick *et al.*, 1985) y como consecuencia, en el establecimiento de los líquenes simbióticos (Elifio *et al.*, 2000; Molina & Vicente, 2000).

Los hongos liquenizados conservan la capacidad para producir y dispersar ascosporas apo-simbióticas (meiosporas que se desarrollan en un compartimiento fúngico del que está excluido el fotobionte en gran medida). Estas ascosporas son capaces de detectar y seleccionar potenciales fotobiontes compatibles presentes en el medio, con el fin de que una relación simbiótica pueda ser reestablecida de *ново* (Miao *et al.*, 2012).

Así mismo, estas proteínas también han sido relacionadas con mecanismos de reconocimiento planta-patógeno (Chrispeels & Raikhel, 1991; Epstein & Nicholson, 1997; Van Damme *et al.*, 1998), mecanismos de defensa frente a predadores (Hoedemaeker *et al.*, 1993; Peumans & Van Damme, 1995; Bleuler-Martínez *et al.*, 2011), asociaciones

simbióticas como el reconocimiento entre bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium* o *Bradyrhizobium*) y las raíces de leguminosas (Smit *et al.*, 1992; Weisneiwski & Delmotte, 1996) y otras muy diversas. Teniendo en cuenta su papel en reconocimiento de superficie y la determinación de especificidad en otros sistemas biológicos, parece probable que las lectinas estén implicadas en una o más etapas en la interacción entre simbiontes en los líquenes (Miao *et al.*, 2012).

Bubrick y colaboradores (1981) adjudicaron por primera vez el término “proteína de reconocimiento” a ciertas glicoproteínas producidas por líquenes. Estas proteínas parecían ser producidas por el hongo liquénico y se localizaban en la superficie de las hifas del micobionte (Bubrick & Galun, 1980; Bubrick *et al.*, 1981). Eran capaces de unirse a la superficie del fotobionte y discriminar entre algas compatibles e incompatibles (Bubrick & Galun, 1980; Galun & Bubrick, 1984).

Las lectinas son glicoproteínas altamente conservadas con un alto grado de homología (Fariers *et al.*, 1977; Chrispeels & Raikhel, 1991). Estudios bioquímicos (Molina & Vicente, 2000; Legaz *et al.*, 2001) indican la similitud entre arginasas segregadas por *E. prunastri* y *X. parietina* con respecto a su composición aminoacídica e incluso con arginasas de otros hongos y plantas (Sacristán *et al.*, 2008). En algunos casos, se han detectado isoformas de la misma glicoproteína (Tabla I) con diferencias en su actividad citoaglutinante específica (Petrescu *et al.*, 1993), digestión enzimática post-trasncripcional (Hoedemaker *et al.*, 1993) o estructura terciaria (Yagi *et al.*, 1994).

Isoforma	kDa	Número de monómeros	pI ^a	Km (mM)	n _H ^b
I (inducida)	18	10	5,86	1,5	1,4
III (constitutiva)	23	12	6,18	4,5	4,4
IV (secretada)	20	12	5,60	4,45	1,24

Tabla I. Isoformas de arginasa secretada y purificada a partir del líquen *E. prunastri*. (a): estimado por electroenfoque en columna, (b): derivado de la ecuación de Hill (Adaptado de: Planelles & Legaz, 1987; Pedrosa & Legaz, 1995; Molina *et al.*, 1997)

Bubrick & Galun (1980) aislaron una fracción proteína de *Xanthoria parietina* por precipitación con sulfato amónico al 60% de un extracto salino libre de células. Usando esta proteína marcada con fluorescamina, demostraron que se unía fuertemente a fotobiontes recién aislados de *X. parietina*, *Caloplaca auriantia* y *C. citrina*. No obstante, esta fracción

proteica no se unía a ficobiontes de especies pertenecientes a familias filogenéticamente más distantes como, *Cladonia convoluta*, *Ramalina duriaei* y *R. pollinaria*. La proteína unida a las algas fue localizada en la superficie celular y debido a la intensidad no fue posible saber si estaba restringida a la pared celular o también se unía a la membrana. Sin embargo, la unión de la proteína marcada a fantasmas o paredes celulares de algas sin protoplasto, sugiere que la proteína se une ante todo a la pared celular. Esta proteína, denominada ABP (Algal-Binding-Protein), fue encontrada en el micobionte de *Xanthoria* cultivado *in vitro* (Bubrick *et al.*, 1981) y aparecía uniformemente distribuida a lo largo de toda la longitud de las hifas y restringida a sus paredes celulares. La hipótesis propuesta por Galun implicaba un quimiotactismo positivo del alga potencialmente compatible (Figura 5).

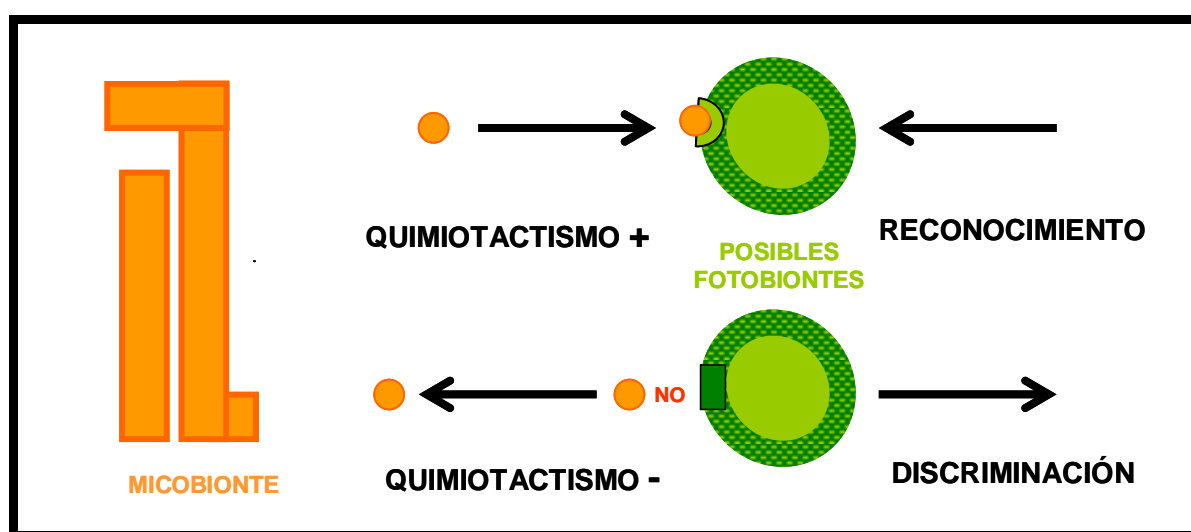


Figura 5. Hipótesis de reconocimiento-discriminación entre simbiontes líquenicos de la Prof. Margalith Galun, basada en sus propios trabajos con lectina ABP de *X. parietina*.

Esta proteína fue parcialmente purificada y caracterizada por Bubrick y colaboradores (1985) como un polipéptido de baja masa molecular (12,5 kDa). Lectinas con actividad aglutinante han sido obtenidas a partir de otros líquenes como *Dictyonema glabratum*, purificada como una proteína dimérica compuesta por dos monómeros idénticos de 16,5 kDa (Elifio *et al.*, 2000) o *E. prunastri* con hasta cuatro isoformas distintas de arginasa con pesos comprendidos entre 18-26 kDa (Pedrosa, 1993).

Para que las lectinas actúen como proteínas de reconocimiento deben cumplirse una serie de condiciones (Galun & Kardish, 1995):

- i) La lectina debe ser producida por el hongo independientemente de su situación simbiótica.

- ii) Debe ser una proteína de superficie para posibilitar el contacto estérico directo con potenciales fotobiontes.
- iii) Debe haber sitios específicos de recepción para la lectina sobre la superficie del fotobionte potencial, lo cual implicaría la relación de reconocimiento.
- iv) La proteína será capaz de discriminar entre fotobiontes compatibles e incompatibles.
- v) Debe haber fotobiontes compatibles en el ambiente inmediato al hongo para que la lectina pueda unirse a ellos.

Todas las glicoproteínas de origen liquénico estudiadas hasta ahora como factores de reconocimiento celular cumplen los requisitos especificados (Sacristán, 2009).

2.2. Especificidad de las lectinas

Desde el descubrimiento inicial de un factor hemaglutinante en extractos *Ricinus communis*, denominado como proteína ricina (Stillmark, 1888), varios cientos de lectinas se han aislado y caracterizado en detalle con respecto a su especificidad de unión a carbohidratos, estructura molecular y las propiedades bioquímicas. En función del ligando monosacárido hacia el cual presentan mayor afinidad, las lectinas se clasifican en cinco grupos: manosa, galactosa/N-acetilgalactosamina, N/ acetilglucosamina, fucosa y ácido n-acetilneuramínico (Lis & Sharon, 1998). Sin embargo hay que señalar que esta clasificación ignora ciertos monosacáridos importantes como manosa-6-fosfato y N-acetilgalactosa-4-sulfato (Ambrosi *et al.*, 2005). Con la excepción de la fructosa, todos estos azúcares se encuentran en la configuración D. A pesar de la débil unión proteína-carbohidrato, con disociaciones constantes en el rango minimolar para monosacáridos, la especificidad de la lectina es generalmente alta (Goldstein *et al.*, 1986; De Hoff *et al.*, 2009), para lo cuál las proteínas interactúan con hidratos de carbono de forma no covalente de una manera que suele ser reversible y específica (Liener *et al.*, 1989). Aparte de unas pocas excepciones, las lectinas específicas para glucosa no se unen a galactosa, ni las específicas para la galactosa se unen a manosa. Curiosamente, ciertas variaciones en la posición C-2 del anillo de piranosa se pueden tolerar, de manera que la mayoría de las lectinas que se unen a galactosa también interactúan con la N-acetilgalactosamina (Ambrosi *et al.*, 2005).

Concanavalina A (Con A), fue la primera lectina aislada (Sumner, 1919) y se considera proteína prototipo de las lectinas de la familia *Leguminosae* (Ambrosi *et al.*, 2005). Este tipo de proteínas consisten en dos o cuatro subunidades idénticas o casi idénticas

(protómeros) de 25-30 KDa cada una, donde cada protómero contiene un sitio de unión para hidratos de carbono, un Ca^{2+} fijado fuertemente y un ion metálico por lo general Mn^{2+} .

Durante los últimos años ha habido un progreso significativo en estudio de las lectinas y su unión con hidratos de carbono. La cristalografía de rayos X de las proteínas y sus ligandos, han permitido la identificación de los grupos químicos que pertenecen a ambas especies e interactúan implicados en la unión y de los tipos de enlace formado (Ambrosi *et al.*, 2005). Los centros de unión para carbohidratos son a menudo depresiones poco profundas en la superficie de la proteína. En todos los casos el sitio de unión parece ser preformado (Weis & Drickamer, 1996) ya que se producen pocos cambios conformacionales tras la unión. En todas las lectinas de leguminosa, con independencia de su especificidad, cuatro aminoácidos participan de forma invariable en la unión a su ligando: ácido aspártico, asparagina, glicina y un ácido aromático (Sharon, 1993) o leucina (Inverti *et al.*, 1994). El Ca^{2+} y Mn^{2+} (u otro metal de transición) se encuentran alrededor en estrecha proximidad a la zona de unión con el azúcar. Aunque no están directamente implicados en la unión de hidratos de carbono, los cationes ayudan al posicionamiento de los residuos de aminoácidos que interactúan con el glicósido (Lis & Sharon, 1998). En *E. prunastri* y *X. parietina*, la adición simultánea de Ca^{2+} y Mn^{2+} a los medios de incubación de ficobiontes recientemente aislados, incrementa fuertemente la eficiencia de la unión de las lectinas a la pared de las algas, estando de acuerdo con la dependencia de Ca^{2+} para la unión de la lectina a su ligando (Zu-Salzman *et al.*, 2002).

Muchos ficobiontes aislados de diferentes especies de líquenes y cultivados después, son capaces de unirse a lectinas comerciales (Marx & Peveling, 1983). La proteína ABP, parcialmente purificada del ficobionte de *X. parietina*, es capaz de unirse a concanavalina A de *Canavalia ensiformis* y ricina de *R. communis* (Bubrick *et al.*, 1985) así como *E. prunastri* es capaz de unirse a concanavalina marcada con fluoresceína (Fontaniella *et al.*, 2004).

2.3. El hongo liquenizado produce lectinas con diferentes roles

Dentro de las lectinas producidas por el líquen *X. parietina* una de ellas fue identificada como ABP (Algal-Binding-Protein) mientras que la segunda isolectina se denominó SAX (Arginasa Segregable de *Xantoria parietina*) y se comportaba como una arginasa segregable. Ambas isolectinas fueron consideradas como fitotoxinas, ya que producían efectos perjudiciales en las células del alga incompatible tales como, pérdida de

clorofilas (Molina & Vicente, 1993) y aumento de la concentración de poliaminas endógenas (Molina & Vicente, 1995). ABP de *X. parietina* se ha caracterizado como un arginasa glicosilada capaz de hidrolizar la arginina en ornitina y urea (Molina *et al.*, 1993), mientras que el resto glucídico contiene cantidades equimolares de N-acetil-glucosamina y D-glucosa. *E. prunastri* produce tanto ABP como SAE (Arginasa Segregable de *Evernia prunastri*), donde el resto polisacárido de la enzima segregada se compone de fructosa, manosa y glucosa (Planelles & Legaz, 1987).

La unión de SAE y SAX a sus ligandos puede ser revertida por galactosa (Legaz *et al.*, 2004) en cualquier condición, lo que claramente define que residuos de galactosa están envueltos en la unión específica. La base molecular de reconocimiento celular y discriminación se muestra en la figura 6.

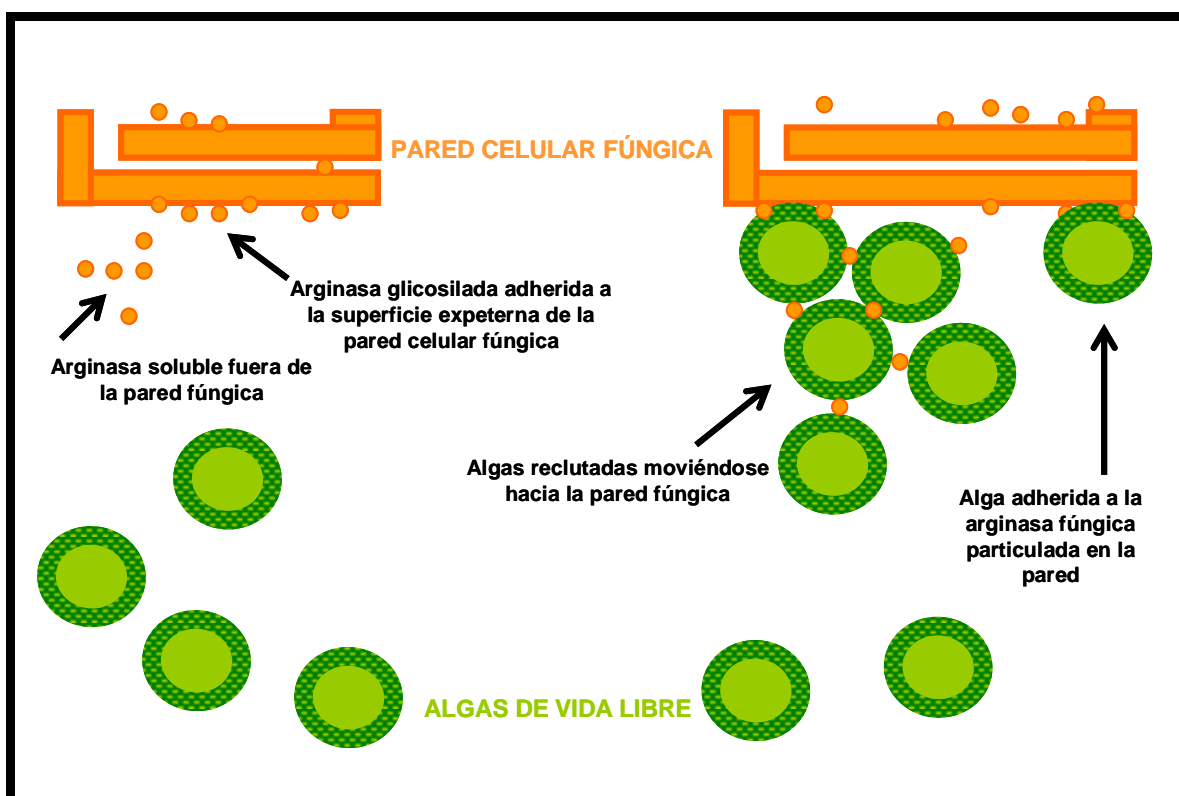


Figura 6. Reconocimiento de potenciales fotobiontes basado en lectinas producidas por el micobionte (Adaptado de: Vicente *et al.*, 2008).

En resumen, el micobionte produce dos clases de lectinas con diferentes funciones:

- i) Lectinas ABP que promueven la interacción física entre el hongo y el fotobionte específico.

- ii) Lectinas segregables, cuyo papel puede ser el reclutamiento de células algales hacia el micelio fúngico. Esto puede constituir un mecanismo para optimizar la unión, aumentando las probabilidades de contacto productivo y también así evitar la pérdida de contacto que seguiría a la muerte de células de algas que ocasionalmente se produce durante las primeras etapas de la asociación.

Teniendo en cuenta que las lectinas presentes en el líquen se han relacionado con el reconocimiento de superficie y la determinación de especificidad entre biontes, cabe pensar si el mecanismo de actuación de estas moléculas pueda estar relacionado con la modulación del movimiento del fotobionte en el interior del talo líquénico.

2.4. Receptor específico para lectinas

La unión de la arginasa fúngica a su ligando en la pared celular de algas implica un mecanismo de afinidad entre algunos restos aminoacídicos de la lectina y residuos específicos de azúcares de fracción glicosilada del ligando (Legaz *et al.*, 2003; Fontaniella *et al.*, 2004).

El fotobionte de *E. prunastri* presenta en su pared celular una cadena poligalactosa unida a un polipéptido con actividad ureasa (Perez-Urria & Vicente, 1989), por lo que se propuso la idea de que esta ureasa glicosilada podría ser el receptor de las lectinas producidas por el hongo liquenizado (Molina *et al.*, 1993). Legaz y colaboradores (2004) observaron una actividad ureasa asociada a la pared de los fotobiontes de los líquenes *E. prunastri* y *X. parietina*. Esta actividad era completamente inhibida cuando fracciones de pared celular de los ficobiontes de ambos líquenes eran incubados con arginasa secretada de *E. prunastri* y *X. parietina* respectivamente. Sin embargo, la actividad ureasa era de nuevo recuperada tras una segunda incubación con α -D-galactosa. La naturaleza del ligando, definido como ureasa glicosilada, se confirmó por cromatografía de afinidad usando una fase estacionaria constituida por arginasa segregada a partir de ambos líquenes inmovilizados en distintas columnas cromatográficas con agarosa activada con bromuro de cianogeno. En ambos casos se observó una alta actividad ureasa cuando la proteína se desorbió con galactosa 100 mM.

La lectina de *E. prunastri*, una vez unida a su ligando, se muestra inactiva para hidrolizar arginina. La hidrólisis de la mitad galactosilada de la ureasa de las algas intactas con α -1,4-galactosidasa libera altas cantidades de D-galactosa e impide la unión de la lectina a la

pared celular del alga. Sin embargo, la utilización de β -1,4-galactosidasa libera bajas cantidades de D-galactosa de la pared celular y no cambia el patrón de unión de la lectina a su ligando (Sacristán, 2009).

La ureasa es una enzima no-constitutiva pero inducible y no es detectada de continuo en los talos líquénicos en condiciones naturales durante el año (Legaz *et al.*, 1986) y es la verdadera ubicación de esta enzima, un punto crucial para determinar las relaciones de compatibilidad entre un hongo y sus potenciales fotobiontes. Mediante detección citoquímica por cloruro de cobalto, aproximadamente el 80% de la actividad ureasa total en *E. prunastri* se asocia a la pared celular (Millanes *et al.*, 2004), sin embargo la actividad ureasa es detectada en invierno, aunque disminuye en primavera, desaparece completamente en verano y el proceso biosintético vuelve de nuevo a empezar a finales del otoño (Legaz *et al.*, 1986). En condiciones de laboratorio, la enzima ureasa puede ser inducida a partir de líquenes intactos o por cultivo de ficobiontes de varias especies líquénicas (Vicente & Legaz, 1987; Vicente & Pérez-Urria, 1989, Molina *et al.*, 1993).

2.5. Lectina fúngica, ¿sustancia quimioattractante para los fotobiontes?

Quimiotaxis, denominado como el movimiento de un organismo móvil hacia una sustancia química, es un suceso temprano que se desarrolla en cualquier simbiosis de tipo mutualista o patogénica. Por analogía, la respuesta de los organismos no móviles hacia una sustancia química es denominada quimiotropismo (Knight & Adams, 1996). La mayoría de los estudios de quimiotaxis y/o quimiotropismo en plantas se centran en la fusión de gametos, donde las sustancias fenólicas con función de señalización son abundantes (Mascarenhas, 1978).

El modelo de quimiotaxis propuesto por Stossel (1978) para leucocitos humanos sugiere que el factor quimiotáctico se une a las superficies celulares e inicia una compleja serie de eventos que culminan en la movilización o la polarización de receptores quimiotácticos en la parte posterior de la migración celular. Muchas células eucarióticas, incluyendo amebas, *Dictyostelium discoideum*, fibroblastos y neutrófilos son capaces de responder a los gradientes quimiotácticos con alta sensibilidad (Levine *et al.*, 2006). Un número de los componentes clave, incluyendo pleckstrina (dominio PH) y proteínas Ras, se localizan rápidamente y de manera uniforme a la membrana después de una estimulación en gradiente (Parent *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2004). Esta localización es seguida por una pérdida casi total de la localización en la parte posterior de la célula, mientras que estos

componentes permanecen localizados en la parte frontal de la misma (Janetopoulos *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004). Se ha comprobado que lectinas de leguminosas provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *C. ensiformis* (Con A), *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM), inducen una respuesta quimotáctica en neutrófilos humanos (Kuehn & van Epps, 1980) cuando previamente se adhieren a receptores presentes en la superficie celular. Algunas de estas lectinas provocan citoaglutinación en células bacterianas en la vecindad del pelo radicular de la planta huésped como un reclutamiento cooperativo de células vivas para facilitar su penetración en dicho pelo (Chrispeels & Raikhel, 1991).

En cianolíquenes como *Leptogium corniculatum* (Vivas *et al.*, 2010), las lectinas segregadas por el propio talo producen reclutamiento y adhesión de fotobiontes a la superficie de las hifas. Para completar este último paso del proceso, las células reclutadas por la lectina deben moverse hacia la superficie de las hifas para establecer contactos adhesivos célula a célula. Aunque el conocimiento de la quimiotaxis de cianobacterias en asociaciones de plantas o líquenes es escaso, existe alguna evidencia que apoya esta hipótesis. Estudios realizados con cepas de *Nostoc* sp. y la hepática *Blasia pusilla* (L.), determinan que la planta hospedante produce señales químicas que guían por quimioatracción a la cianobacteria hasta cavidades especializadas denominadas aurículas, donde se desarrollarán las colonias simbióticas. (Adams & Duggan, 2008). Si esto es así, parece lógico la posibilidad de considerar las lectinas fúngicas como un agente quimioattractante, siendo esta una hipótesis clave en la presenta memoria.

3. COMPATIBILIDAD COMO RECONOCIMIENTO ENTRE BIONTES FRENTE A INCOMPATIBILIDAD COMO DESCRIMINACIÓN CELULAR

Las etapas iniciales del desarrollo natural de los líquenes *in situ* e *in vitro* han sido el foco de numerosos estudios sobre la compatibilidad y la selectividad entre simbiontes (Ahmadjian *et al.*, 1980; Ahmadjian & Jacobs, 1981; Bubrick *et al.*, 1985; Galun & Garty, 1988; Kon *et al.*, 1993; Ott, 1987; Schaper & Ott, 2003). Por otro lado, el reconocimiento debe ser continuo para que el equilibrio simbiótico se mantenga en el tiempo (Legaz *et al.*, 2003). La secuencia de eventos que conducen a un talo estratificado se puede resumir en cuatro etapas básicas: etapa uno, pre-contacto, anterior al contacto físico de los simbiontes pero lo suficientemente cerca para que las interacciones extracelulares son posibles; segunda etapa, a principios del contacto, donde las células fúngicas toman contacto con las células de algas por apresorios y / o posteriormente las envuelven a través de un aumento en ramas laterales; etapa tres, la incorporación de unidades de cultivo de hongos y algas en

una masa indiferenciada, y la cuarta etapa, la diferenciación de los tejidos estratificados (Ahmadjian *et al.*, 1978; Bubrick *et al.*, 1985; Galun, 1988). Los mecanismos moleculares que subyacen a esta secuencia de eventos son desconocidos hasta la fecha (Joneson & Lutzoni, 2009).

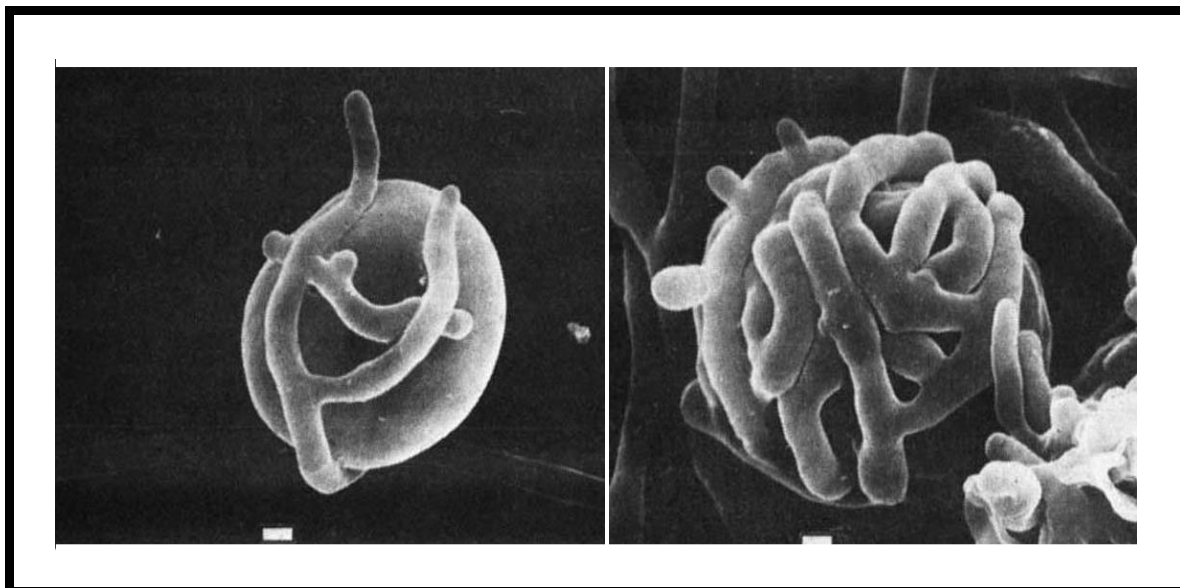


Figura 7. Desarrollo del micobionte alrededor de células de *Treobouxia* (Tomado de: Ahmadjian & Jacobs, 1981).

Comenzando con la primera etapa de desarrollo, cuando los hongos y organismos fotosintéticos no interactúan para formar cualquiera de las etapas iniciales del desarrollo del líquen se consideran no compatibles (se incluyen interacciones neutrales y negativas). Los simbioses se consideran compatibles cuando entran en la segunda fase de desarrollo del líquen, a través del aumento de la ramificación lateral por parte de las hifas del hongo. En algunas interacciones, los biontes compatible forman sólo las primeras etapas de desarrollo (etapas uno y dos, a veces tres), pero no proceden a formar un talo estratificado. La selección es el proceso mediante el cual simbioses adecuados son elegidos para entrar en la cuarta etapa de desarrollo, dando como resultado la formación de un talo estratificado (Joneson & Lutzoni, 2009). Sólo cuando los simbioses han entrado en la cuarta etapa de desarrollo es la selección un éxito completo. Anteriormente, el desarrollo del micobionte alrededor de las algas de su entorno se consideraba una tigmotaxis o respuesta de crecimiento frente a la presión ejercida sobre un punto. Sin embargo, experimentos con el líquen *Cladonia grayi* determinan que el micobionte no muestra esta respuesta morfológica característica cuando se cultiva con algas no compatibles. Es interesante que *C. grayi* nunca se adhiere a *Chlorella vulgaris*, *Trentepohlia* sp., o *Funaria hygrometrica* y únicamente desarrolla un aumento de las ramas laterales con su fotobionte natural,

Asterochloris sp., lo que sugiere que un micobionte no se adhiere a todas las algas con las que entra en contacto (Joneson & Lutzoni, 2009).

3.1. Incompatibilidad del fotobionte frente a un hongo liquenizado

Cuando las células del fotobionte carecen de ureasa glicosilada en la pared celular, la lectina es internalizada, produciendo un aumento de los niveles de putrescina en algas, que promueve la desorganización del cloroplasto, la activación de glucanasas y la ruptura de la pared celular con pérdida del protoplasto (Molina & Vicente, 1995; Molina *et al.*, 1998). La putrescina, es una poliamina producida en pequeñas cantidades por las células vivas gracias a la acción de la enzima ornitina-descarboxilasa. Junto con la espermidina y la espermina, constituyen las principales poliaminas en plantas y cianobacterias (Bouchereau *et al.*, 1999). Las poliaminas son importantes e incluso esenciales para muchos procesos celulares tales como el crecimiento celular, la tolerancia al estrés, la estabilidad de membrana o la síntesis de proteínas (Flink & Pettijohn 1975; Capell *et al.*, 2004; Kusano *et al.*, 2008). En algas recién aisladas del líquen *X. parietina*, el contenido inicial de putrescina libre es $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (Legaz *et al.*, 2003) y no es afectado con adición de lectina al medio. Sin embargo, cuando los fotobiontes son incubados sobre arginina 28 mM durante 30 min, la concentración de esta amina biógena aumenta en el interior de las algas hasta $226 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Este aumento de la arginina exógena *in vitro* simula una posible situación en la cual una parte de la arginina en el interior del talo aumenta y puede ser translocada al alga (Legaz *et al.*, 1986), por rehidratación de la muestra. El aumento de la cantidad de arginina eleva la cantidad de putrescina después de la adición de lectina a los ficobiontes. Esto implica que la arginina, que sería lentamente descarboxilada en el alga por una arginina descarboxilasa, sería ahora rápidamente hidrolizada por la lectina añadida, que no es detenida en la superficie celular por falta de ligando inducido (Legaz *et al.*, 2003).

Con respecto a la afinidad de la arginasa por la arginina, es del orden de 60 veces más alta que la afinidad de la arginina descarboxilasa por el mismo aminoácido (Vicente & Legaz, 1981; Legaz & Vicente, 1982). Así mismo, la adición de arginasa fúngica a ficobiontes con ureasa de pared previamente inducida, presentan un ligero decrecimiento en la cantidad de putrescina (Legaz *et al.*, 2003). Este cambio en la concentración sólo puede ser posible gracias a la actividad de la lectina, que penetraría en el interior de las células que no poseen el ligando específico para dicha glicoproteína en sus paredes celulares.

3.2. Eliminación de algas incompatibles mediante muerte programada

Existen una serie de eventos que se desarrollan en paralelo a la acumulación de putrescina después de la entrada de lectinas fúngicas en el interior de células de ficobiontes sin ureasa glicosilada en su pared celular. Mediante microscopía electrónica de transmisión (Legaz *et al.*, 2003) se han podido observar algunos daños estructurales en fotobiontes no compatibles para *X. parietina* (Molina *et al.*, 1995), tales como: aparición de grandes espacios periplasmáticos, pérdida de material citoplasmático, deterioro de la membrana plasmática, compactación de las membranas tilacoidales o desaparición del pirenoide. Cuando se analiza la cantidad de polisacáridos mediante la técnica PATAg, los espacios periplasmáticos de las células tratadas con lectinas fúngicas, contienen grandes cantidades de polisacáridos, materiales de membrana así como abundantes cuerpos vesiculares. Esto es interpretado como un intento de la célula de reparar los daños inducidos en las paredes celulares, una especie de mecanismo de resistencia frente al ataque fúngico (Legaz *et al.*, 2003). No obstante, este mecanismo de resistencia no suele tener éxito, ya que el número de células muertas se incrementa de manera notable después de la entrada de las arginasas fúngicas glicosiladas en el interior de las algas que no poseen el ligando inducido en su pared celular.

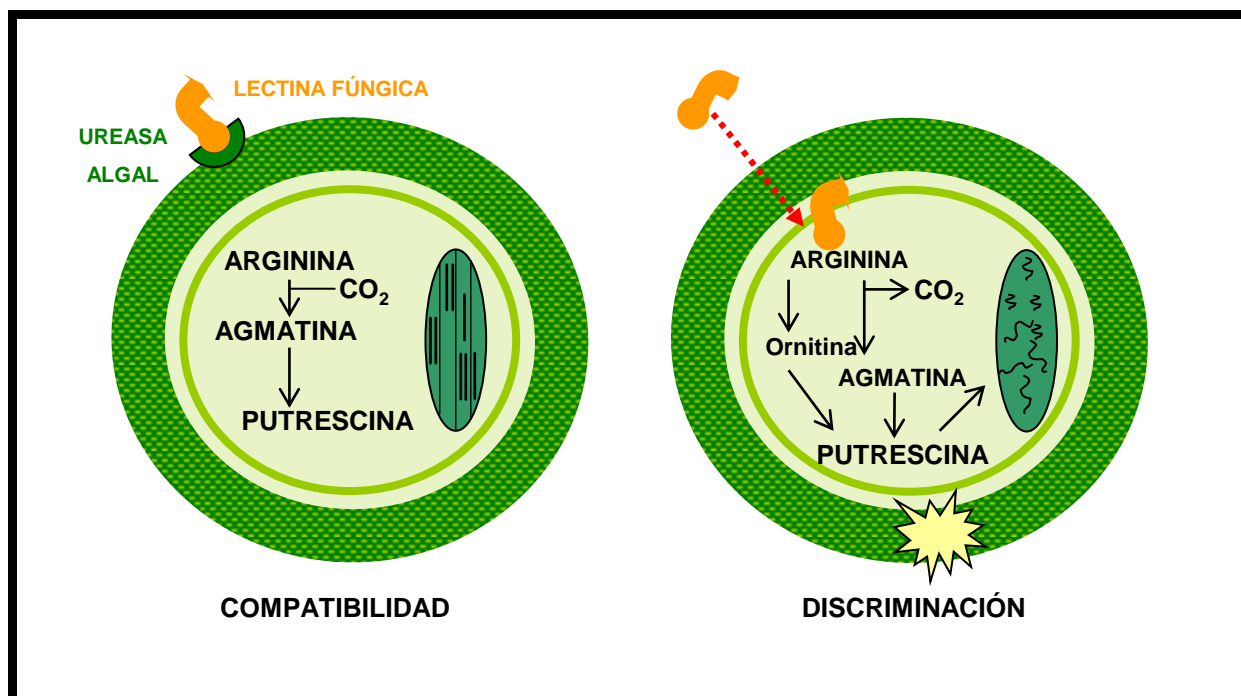


Figura 8. El potencial micobionte produce y segrega una arginasa glicosilada. La lectina puede adherirse a un ligando de pared con actividad ureasa presente en las células del alga (Compatibilidad) y produce el reclutamiento de células algales, un paso clave en reconocimiento celular entre biontes. En ausencia del ligando (Discriminación) la lectina penetra en el interior del alga produciendo un aumento de los niveles de putrescina y activación de glucanasas que lleva finalmente a la muerte de la célula fotosintética.

De acuerdo con las teorías de coevolución y virulencia (Ahmadjian, 1987), los efectos perjudiciales producidos por un hongo liquenizado sobre el fotobionte podrían ser drásticos después de un breve contacto físico entre biontes. Esto implica una rápida acción química, más que física, debido al lento desarrollo de haustorios por parte del micobionte. La activación de glucanasas por parte del alga como consecuencia de la entrada de lectinas y la consecuente sobreproducción de putrescina, está claramente relacionada con la hidrólisis de la capa celulósica de la pared celular (Molina *et al.*, 1998).

4. EL RECONOCIMIENTO CONTINUO ENTRE BIONTES GARANTIZA EL MANTENIMIENTO DE LA ASOCIACIÓN

El reconocimiento de un fotobionte compatible por su socio potencial es absolutamente necesario no sólo para la formación *de novo* de nuevas asociaciones, sino también para el mantenimiento del equilibrio simbiótico del liquen. Cuando las células de algas se multiplican dentro de un talo creciente, las células hijas son envueltas por hifas de los hongos, que reconocen células nuevas como compatibles (Ahmadjian, 1993).

La interacción entre mico- y fotobiontes es proporcionada por lectinas (Petit *et al.*, 1983; Stocker-Wörgötter, 2001), capaces de unirse a residuos oligosacáridos presentes en la pared del fotobionte con una alta especificidad, un factor clave en el reconocimiento y la selección de los simbioses (Petit *et al.*, 1983; Kardish *et al.*, 1991; Lehr *et al.*, 2000; Paulsrud *et al.*, 2001; Stocker-Wörgötter, 2001).

Aunque la producción del ligando de la lectina debería ser coincidente exactamente en el tiempo con la reproducción algal, los máximos de actividad de arginasa y ureasa no coinciden en el tiempo en talos de líquenes como *E. prunastri*. En condiciones naturales, la lectina fúngica es segregada principalmente en primavera mientras que la ureasa (Sacristán, 2009), queda restringida a finales del otoño o las primeras semanas del invierno (Legaz *et al.*, 1986). Así mismo, estudios con *Flavoparmelia caperata* muestran que durante los períodos de julio-septiembre y enero-marzo, la cantidad de células en división de la población del ficobionte (*Trebouxia*) es muy baja (Slocum *et al.*, 1980). No sólo es variable el número de fotobiontes totales sino su tamaño, como en *Hypogymnia physodes*, donde el número de células *Trebouxia* recogidas en enero es de 2,5 veces mayor que en junio y con un tamaño promedio pequeño, mientras que la mayoría de las células alcanzan su tamaño más grande a partir de marzo hasta finales de octubre (Fiechter & Rhonegger, 1988).

Ejemplos similares aparecen en *Cetraria islandica*, *Cladonia arbuscula*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* y *Peltigera rufescens* (Czeczuga & Krukowska, 2001). La evolución de las relaciones simbióticas implica entonces, la sincronización de la división celular y la producción del ligando de lectina probablemente, como consecuencia de la percepción de los factores ambientales como la luz y la temperatura (Vicente *et al.*, 2008).

Resulta interesante el caso de *P. aphthosa*, donde se ha observado que la concentración de lectina entre la parte apical y basal difiere considerablemente (Feoktistov *et al.*, 2009). Esta distribución, es coincidente con varios factores como: la intensidad de fijación de nitrógeno (Hill, 1989; Rai, 1990), el tamaño celular del fotobionte (Hill, 2001), distribución de heterocistes (Janson *et al.*, 1993), la concentración de la nitrogenasa en las células del cianobionte y la concentración de glutamato deshidrogenada en el micobionte (Rai & Bergman, 2002). Dicha distribución podría considerarse un mecanismo que facilita la interacción entre foto- y micobiontes e incluso la captación de nuevos socios fotosintéticos por parte de hongo liquenizado posibilitando su reconocimiento, mucho más probable, en zonas periféricas del talo que en la parte basal del mismo.

5. MECANISMO DE RECONOCIMIENTO EN CIANOLÍQUENES

Rikkinen (2002) ha descrito un modelo para la transducción de señal entre cianobiontes en cianolíquenes (Figura 9). Se conocen dos tipos de elicitores de señal: elicitores generales, sin mayores diferencias en sensibilidad entre los organismos que responden a la señal, y elicitores específicos, que funcionan según vías diferentes. Los elicitores generales suelen ser sustancias asociadas al metabolismo primario e incluyen glucanos, glicopéptidos, oligómeros de quitina, fragmentos de paredes celulares y muchos fenoles. Los elicitores específicos pueden incluir proteínas, péptidos, sirincólidos y compuestos fenólicos.

No obstante, no existe ninguna evidencia experimental conocida acerca de la implicación de los fenoles de líquenes en el reconocimiento de fotobiontes compatibles y además, los cianolíquenes no producen fenoles específicos (Vicente *et al.*, 2008).

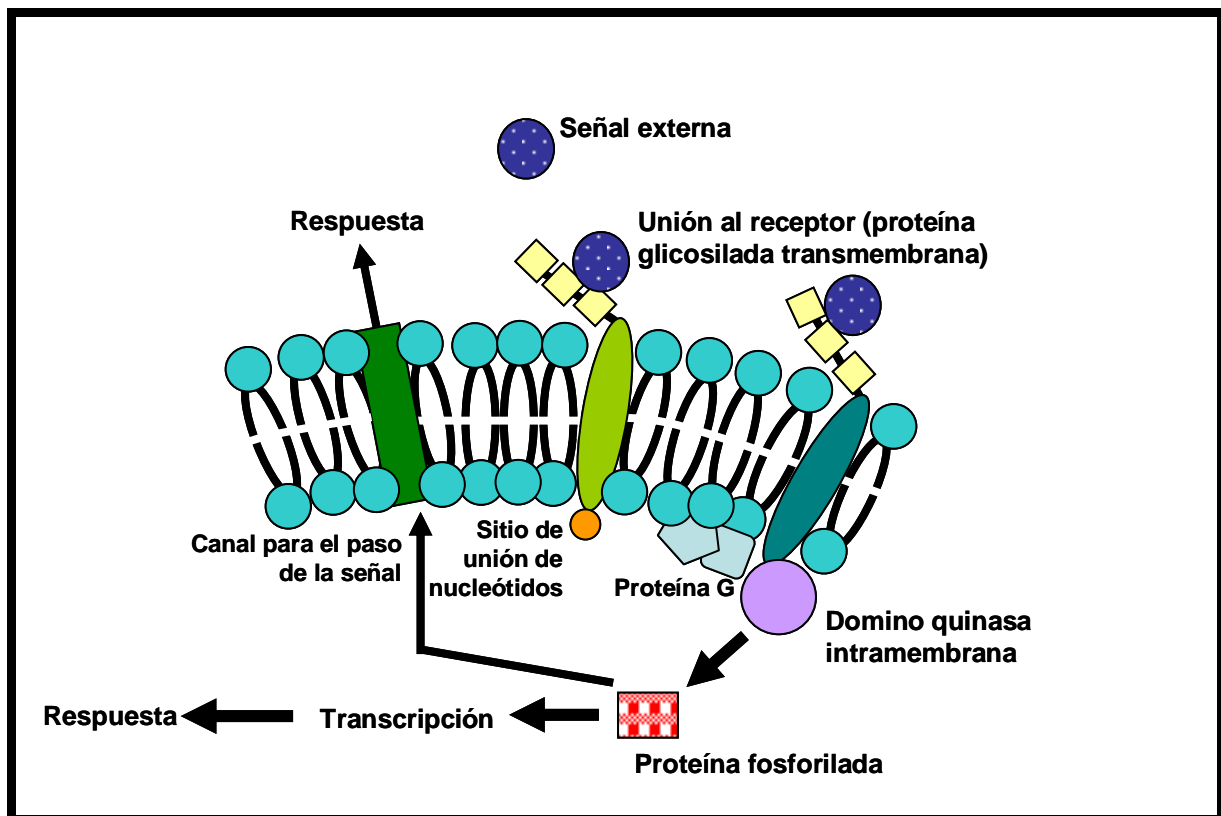


Figura 9. Esquema del modelo de reconocimiento entre cianobacterias y micobiontes compatibles (Adaptado de: Rinkinen, 2002).

Cianobiontes potenciales de vida libre, como *Nostoc* sp., producen filamentos especializados productores de heterocistes, (denominados hormogonios) antes de intentar una relación simbiótica (Meeks, 1998; Adams, 2000; Vicente *et al.*, 2008). El desarrollo de hormogonios es el resultado de una rápida y sincronizada división celular que tiene como consecuencia un descenso del tamaño medio de las células (Meeks & Elia, 2002; Meeks *et al.*, 2002) seguido de la fragmentación del filamento. La liberación de hormogonios es inducida por la combinación de diversas condiciones biológicas y ambientales, tales como una depresión en la disponibilidad de nitrógeno combinado, un exceso de hierro o fosfatos, el cambio de luz blanca a roja o mediante señales transmitidas por un factor de inducción de hormogonia (HIF) producido por el huésped potencial (Meeks & Elia, 2002). La producción de HIF ha sido reportada en varias especies de briófitos (Meeks, 2003) cícadas y angiospermas (Rasmussen *et al.*, 1994; Ow *et al.*, 1999).

El hospedante potencial emite señales químicas que estimulan la formación de los hormogonios y por quimioatracción, guía a la cianobacteria hasta el lugar de entrada al huésped (Adams & Duggan, 2008) de tal manera que pueden ser reconocidos por factores de reconocimiento de hormogonios (HRF) producidos también por el hospedante (Bergman *et al.*, 1993). Sin embargo, la producción de hormogonios, no es suficiente para garantizar la

simbiosis (Johansson & Bergman, 1994). La eficiencia de infección de *Blasia* por parte de la cianobacteria *Nostoc punctiforme* se ve influenciada por mutaciones en el gen *cyaC*, el cuál codifica adenilato ciclasa, enzima responsable de la biosíntesis del mensajero intracelular adenosín monofosfato -3',5' cíclico (AMPC).

Una vez que la cianobacteria establece una relación con el hospedante, se desencadenan una serie de cambios en el cianobionte. El desarrollo de los hormogonios es reprimido, el número de células en división se reduce mientras que la producción de heterocistes (células especializadas en la captación de nitrógeno) es altamente estimulada así como la fijación de CO₂ (Adams & Duggan, 2008).

El reconocimiento de un cianobionte compatible puede ser llevado a cabo también por lectinas (Vicente *et al.*, 2008). En hepáticas y briófitas, la planta produce lectinas que reconocen residuos de azúcares en la superficie celular de *Nostoc* pre-simbiótico (Bergman *et al.*, 1993). Desde que Lockhart y colaboradores (1978) estudiaran por vez primera la capacidad de producir proteínas con capacidad fitoaglutinante en los cianolíquenes *Peltigera polydactyla* y *P. canina*, varias especies del género *Peltigera* se han asociado con la producción de lectinas o proteínas extracelulares con propiedades similares (Petit 1982; Petit *et al.*, 1983.; Lehr *et al.*, 1995; Feoktistov *et al.*, 2009). Algunas de estas lectinas son capaces de distinguir entre cianobacterias simbiotes y cepas extrañas de *Nostoc*, (Pausrud *et al.*, 2001) apoyando la idea de que juegan un papel importante en el proceso de reconocimiento entre los socios potenciales hacia el establecimiento del liquen (Miao *et al.*, 2012).

Lehr y colaboradores (1995) aislaron una lectina en *Peltigera membranacea* que se unía a su simbiote *Nostoc* y a su vez era inhibida específicamente por N-acetil-D-galactosamina y D-galactosa. En *P. aphthosa*, una lectina es capaz de reconocer células compatibles de *Nostoc* en el inicio de la formación de cefaloidos, siendo este un proceso altamente específico (Lehr *et al.*, 2000). Esta lectina es caracterizada como una glicoproteína con una masa molecular de 20 kDa, que desarrolla una alta actividad citoaglutinante revertida por adicción de lactosa a la suspensión celular. *L. corniculatum*, produce y segrega una lectina al medio de incubación. Esta glicoproteína, previamente purificada, es capaz de unirse a la superficie celular de *Nostoc* aislados de su talo líquénico, aunque también es capaz de unirse a la superficie celular de clorobiontes aislados de *E. prunastri* (Sacristán *et al.*; 2007; Vivas *et al.*, 2010).

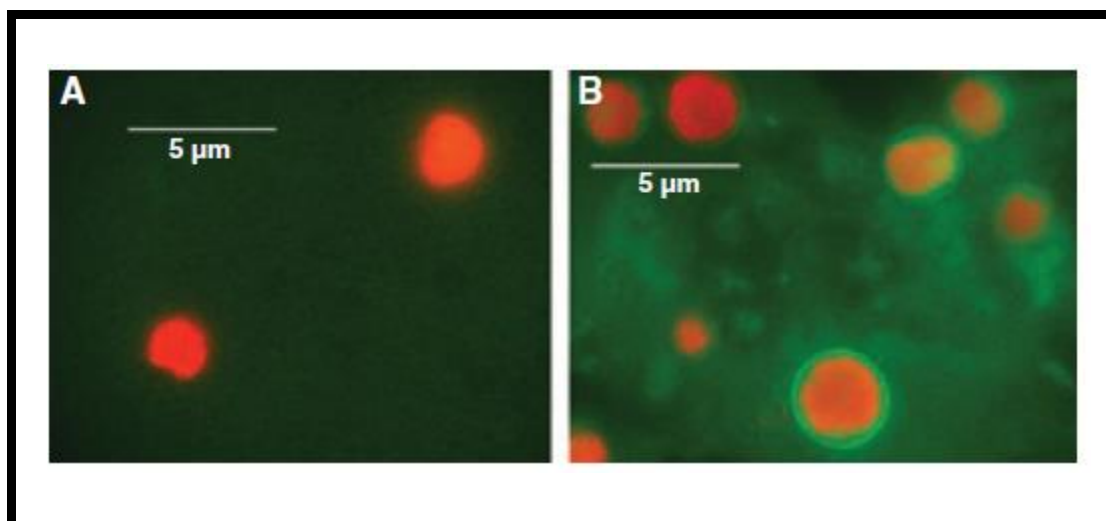


Figura 10. Lectina del cianolíquen *L. corniculatum* unida a *Trebouxia* (clorobionte de *E. prunastri*). (A) Fotobiontes de *E. prunastri* sin tratamiento. (B) Fotobiontes de *E. prunastri* después de una hora en contacto con lectina secretada y purificada de *L. corniculatum* unida previamente a un fluorocromo (Tomado de: Vivas *et al.*, 2010).

Tomando como referencia estos resultados, cabe pensar que el mecanismo de reconocimiento-discriminación en clorolíquenes, esencial para el establecimiento y desarrollo del líquen, es extensible a cianolíquenes. Esto implica la posibilidad de la existencia de un patrón de reconocimiento universal de fotobiontes por parte de hongos liquenizados a líquenes, cuya finalidad es la formación de una nueva entidad por encima de las especies implicadas. Independientemente del patrón de reconocimiento, la capacidad de motilidad por parte del cianobionte es esencial (Adams & Duggan, 2008). A pesar de la enorme importancia que tiene este tipo de organismos, el modo de desplazamiento que realizan las cianobacterias en el interior del talo liquénico es desconocido hasta la fecha.

6. MOTILIDAD DEL CIANOBIONTE

Las cianobacterias son uno de los grupos más antiguos conocidos presentes en la Tierra. En aguas Occidentales del continente australiano, se han encontrado acumulaciones calcáreas formadas por cianobacterias con más de un billón de años de antigüedad. Más de 2000 especies de cianobacterias han sido identificadas hasta el momento y pueden ser encontradas en todas las zonas climáticas del planeta (Guven & Howard, 2006).

Así mismo, son conocidas por su diversidad morfológica, fisiológica y propiedades toxicológicas. Recientemente, la producción de componentes bioactivos con aplicaciones comerciales y medicas ha ido tomando interés en estos organismos (Tan, 2007; Mahdi &

Fariba, 2012). De hecho, junto con la producción de componentes tóxicos, las cianobacterias producen interesantes sustancias en términos antifúngicos, antibióticos y anticancerígenos (Dittmann *et al.* 2001; Volk, 2008). Las cianobacterias se caracterizan por su capacidad de fijar nitrógeno y oxígeno fotosintético, así mismo son muy resistentes a condiciones ambientales extremas. Ello está teniendo una importancia cada vez mayor en áreas fronterizas de la biotecnología, favorecido por la capacidad de una rápida restauración de la actividad bajo condiciones favorables es una característica de este grupo (Pankratova, 1987).

Las cianobacterias son un grupo morfológicamente diverso de procariotas considerado como uno de los primeros grupos en adquirir movilidad direccional (Hoiczky, 2000). El mecanismo de motilidad ha sido considerado como simple y primitivo y solamente una pequeña parte de dicho proceso ha sido entendido (Okamoto & Ohmori, 2002). Sin embargo, la fisiología de esta motilidad ha sido estudiada desde hace años, principalmente en cianobacterias que se desplazan mediante filamentos (Halfen & Castenholz, 1970; Hoiczky, 2000).

6.1. Tipos de movimiento

Un gran número de hipótesis han sido propuestas para explicar la motilidad de las cianobacterias (Hoiczky & Baumeister, 1998) no obstante, la movilidad bacteriana es un proceso complejo que emplea mecanismos tales como *twitching*, *swimming*, *swarming*, *sliding*, o *gliding* (Diehn, *et al.*, 1997; Waterbury *et al.*, 1985) que requieren de apéndices superficiales entre los que destacan cilios, flagelos o fimbrias (Harshey, 2003; Henrichsen, 1972; Jarrell & McBride, 2008).

Muchas bacterias se mueven usando orgánulos de propulsión llamados flagelos (Macnab, 1999). Estos orgánulos, están impulsados gracias a un motor rotativo compuesto de proteínas, situado en el punto de anclaje del flagelo en la membrana plasmática. Tanto ***swimming*** (natación en medio líquido) como ***swarming*** (deslizamiento) están mediados por flagelos y ambos se distinguen puesto que las bacterias que se desplazan mediante *swarming* necesitan una superficie sólida y en algunos casos la diferenciación de células con forma alargada (Harshey, 2003; Jarrell & McBride, 2008; Rather, 2005). Los flagelos generan un movimiento ondulatorio repetitivo y rotatorio sobre su propio eje que dirige a la célula donde la velocidad media del movimiento puede variar entre 20-30 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Macnab, 1978). Este comportamiento es similar tanto en células con uno o con varios flagelos en uno

o ambos polos. Al nadar, los flagelos de ambos polos, se dirigen a la parte trasera de la célula y la dirección varia cuando la rotación de ambos polos se invierte simultáneamente (Krieg, 1976). Las bacterias flageladas mejor estudiadas son *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Silverman & Simon, 1974) mientras que en cianobacterias aparece el movimiento (Häder 1987) pero no se ha observado la presencia de flagelos en ningún caso (Pitta & Berg, 1995).

Twitching (movimiento a “tirones”) es definido originalmente como un movimiento intermitente y espasmódico predominante en células individuales (Henrichsen, 1972). Esta forma de motilidad se produce en una amplia variedad de bacterias (Henrichsen, 1972; Wall & Kaiser, 1999; Mattick, 2002) y para ello se requiere una superficie húmeda que permita moverse a las células hacia delante y hacia atrás a una velocidad de unas décimas de micrómetro por segundo.

Este tipo de movimiento tiene lugar tanto en superficies orgánicas como inorgánicas, incluyendo geles de agar, plásticos, metales, cristal y metales. Es utilizado por las bacterias para desplazarse en entornos con bajo contenido en agua y como medio de colonización de nuevas superficies con alta disponibilidad de nutrientes. Es importante en complejas formas de comportamiento dentro de comunidades bacterianas, incluyendo formación de biopelículas y cuerpos fructíferos (Mattick, 2002). El movimiento tipo *twitching*, esta mediado por un *pili* de tipo IV, situado en uno o ambos polos de la célula (Kaiser, 1979; Bradley, 1980; A Henrichsen, 1983) y aparece en bacterias gram-negativas, principalmente en las subdivisiones β , γ y δ , de Proteobacteria (Henrichsen, 1975; Mattick *et al.*, 1993).

Basándose en el fenotipo *twitching*, la presencia del *pili* polar y/o los genes que codifican para el *pili* de tipo IV, este tipo de movimiento se desarrolla en *Aeromonas hydrophila*, *Azoarcus* spp., *Bacteroides ureolyticus*, *Branhamella catarrhalis*, *Comomonas testosteroni*, *Dichelobacter nodosus*, *Eikenella corrodens*, *Kingella denitrificans*, *K. kingae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella bovis*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. kingii*, *N. meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. putida*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Shewanella putrefaciens*, *Suttonella indologenes*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Vibrio cholerae*, and *Wolinella* spp., entre otras muchas especies de patógenos de animales, plantas y hongos (Henrichsen, 1975; Mattick *et al.*, 1993; Roine *et al.*, 1993; Dorr *et al.*, 1998; Liles *et al.*, 1998; Fullner *et al.*, 1990; Bhaya *et al.*, 2000; Semmler *et al.*, 2000). La presencia de *pili* de tipo IV situado polarmente es necesaria para el movimiento de las células individuales, así como para el movimiento coordinado de poblaciones de células,

conocido como "motilidad social" en *Myxococcus xanthus* (Wall & Kaiser, 1999; Mattick, 2002).

Sliding o expansión de las células promovida a través de una superficie, se desarrolla según las propiedades de superficie celular (Henrichsen, 1972; Jarrell & McBride, 2008). No existen informes de una estructura particular de la superficie implicada en este tipo de movimiento. Sin embargo, se ha demostrado que un sistema de secreción de tipo I ha demostrado tener un papel en el *sliding* de *L. pneumophila*, donde aparece la secreción de un agente tensioactivo (Stewart *et al.*, 2009).

Gliding (movimiento por "planeo") se conoce como la translocación suave de las células por un proceso activo que requiere gasto de energía (McBride, 2001). Este tipo de movimiento no requiere de orgánulos para el desplazamiento, el movimiento celular sigue el eje longitudinal de la célula y como resultado, las bacterias se deslizan y a menudo son envueltas por un mucílago extracelular durante el proceso (Hoiczyk, 2000). La velocidad de translocación es de 1 a 3 micrometros por segundo, mucho más lenta que el desplazamiento mediado por flagelos o *swimming*, así mismo depende en gran medida de la composición del sustrato y el nivel de hidratación, temperatura, la asociación con otras bacterias (Nultsch, 1962; Buchard, 1981, Castenholz, 1982 Tamulonis *et al.*, 2011). Las bacterias que se desplazan por *gliding* durante la búsqueda de un entorno adecuado para su crecimiento y desarrollo, responden a la cantidad y calidad de la luz (Häder 1987; Hoiczyk, 2000; Chung *et al.*, 2004).

6.2. Hipótesis sobre el desplazamiento de las cianobacterias

Un gran número de especies de cianobacterias, son capaces de desplazarse mediante el tipo de movimiento *gliding* (Castenholz, 1982; Castenholz & Waterbury, 1989; Adams, 1999; Choi *et al.*, 1999; Hoiczyk, 2000; Okamoto & Masayuki, 2002; Tamulonis *et al.*, 2011), así como especies de los mixobacteria, flexibacteria, *Chloroflexaceae*, *Beggiatoaceae* e incluso micoplasmas (Burchard, 1981). Aunque la base mecánica de la motilidad *gliding* no ha sido establecida, varios estudios de microscopía revelan la presencia de ciertas estructuras celulares que sólo se encuentran en especies móviles (Hoiczyk, 2000). La relación entre *gliding* y la secreción extracelular durante el desplazamiento, es reportada por primera vez a mediados del siglo XIX (Doestch & Hageage, 1968). Los movimientos de muchas cianobacterias se caracterizan por la secreción constante de mucílago, que normalmente cubre toda la superficie de la célula o filamento (Hoiczyk, 2000).

En caso de ser eliminado de la superficie, el mucílago es producido de nuevo activamente (Hosoi 1951; Schulz, 1955) y el mismo efecto es observado cuando los filamentos secretan cantidades lo suficientemente pequeñas como para promover la locomoción (Hoiczky & Baumeister, 1998). La estructura de la pared celular de las cianobacterias filamentosas es muy similar a la arquitectura de la pared de las bacterias gram-negativas (Hoiczky & Baumeister, 1995). En comparación con otras bacterias, la capa de peptidoglicanos es considerablemente más gruesa en cianobacterias, cuyo grosor oscila entre 30 a 700 nm, contra los 5 nm presentes en *E. coli*. La pared celular de estos organismos, está rodeada a su vez por una compleja envoltura externa, formada por una capa denominada capa-S, anclada a la membrana externa y una serie de fibrillas de 8-12 nm dispuestas helicoidalmente en la parte superior de la capa-S. En todos los casos, la orientación de las fibrillas está relacionada con el sentido de los filamentos durante la locomoción, en sentido horario en *Phormidium* sp. o en sentido contrario en *Oscillatoria princeps* y *Lyngbya aeruginosa* (Hoiczky, 2000). El mucílago es expulsado al exterior mediante una serie de poros, conocidos como poros de unión, a cada lado del tabique celular de la pared de la cianobacteria (Hoiczky & Baumeister, 1998). Este complejo de poros se encuentra entre la capa de peptidoglicanos y la membrana exterior (Figura 11) y su aparición está relacionada con la capacidad del movimiento. Después de un cultivo prolongado, este orgánulo desaparece dejando vacíos los canales transpéptido-glicano (Hoiczky & Baumeister, 1995), como consecuencia, la producción de mucílago disminuye, sin embargo, la capa-S permanece.

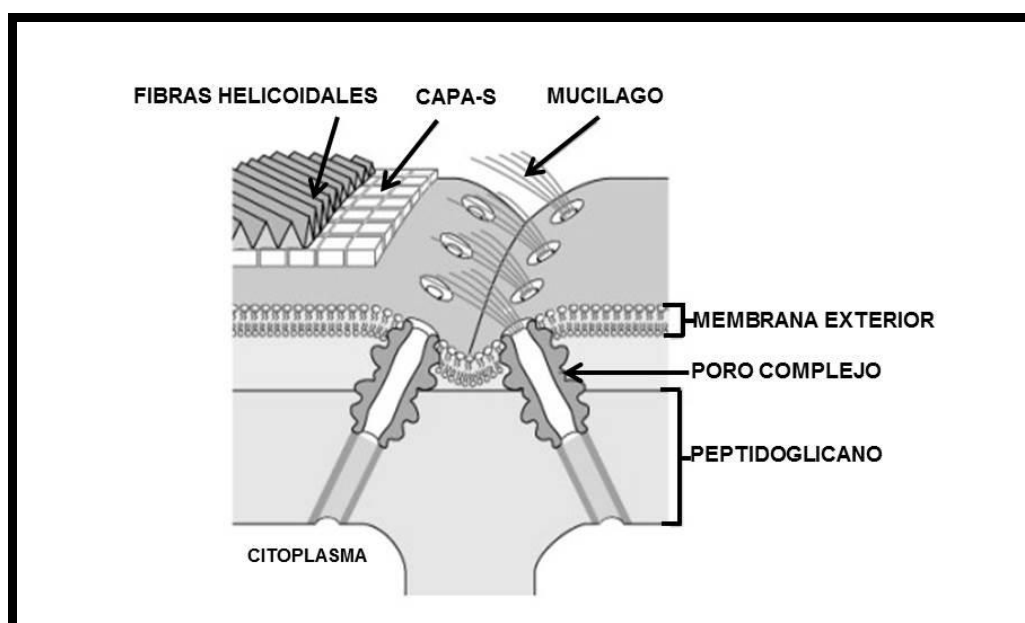


Figura 11. Modelo de poro complejo en *Phormidium uncinatum*. El complejo se extiende por toda la pared que consiste en una membrana externa y una capa de petidoglicanos. El movimiento direccional resulta de la producción de mucílago a partir de un conjunto de poros en un lado del tabique celular (Adaptado de: Hoiczky & Baumeister, 1998).

Una hipótesis alternativa para el desplazamiento tipo *gliding* es la presencia de elementos contráctiles que producen ondulación durante el movimiento (Figura 12). Especies del género *Oscillatoria* (Hafen and Castenholz, 1970; Hafen, 1973; Adams, 1999) presentan bandas de fibrillas contráctiles dentro de la pared celular mientras se desplazan. La fuerza motriz de este tipo de movimiento es la propagación por ondas que se transmiten rítmicamente desde un extremo a otro de la célula o filamento (Halfel, 1971). Estas ondas interaccionan con el sustrato haciendo que el filamento se desplace en dirección opuesta, donde cualquier cambio en la propagación de la onda, produce cambios en la dirección del movimiento.

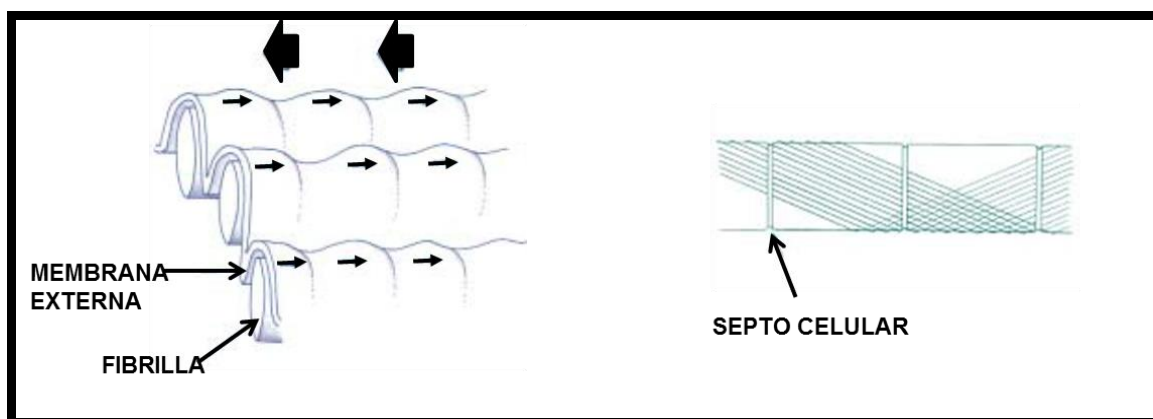


Figura 12. Diagramas esquemáticos que muestran la matriz fibrilar de la pared celular de *Oscillatoria* spp. (A) la parte de filamento que muestra septos celulares células. Cada fibrilla traza una trayectoria helicoidal de 25-30 ° respecto al eje del filamento. (B) Las distorsiones de las fibrillas entre la membrana externa y peptidoglicano (no se muestran) podrían propagarse rítmicamente, como ondas que se mueven de un extremo del filamento al otro. Estas ondas se transmiten a través de la membrana externa (flechas pequeñas) y, por interacción con el sustrato, hacen que el filamento se mueva en la dirección opuesta (flechas grandes) (Adaptado de: Adams *et al.*, 1999).

El diámetro de estas fibrillas es muy similar en todas las especies en las que aparece y sin embargo, la longitud es variable. La composición de las fibrillas no ha sido determinada, aunque en especies del género *Oscillaria* se han identificado como glicoproteínas denominadas oscilinas, con múltiples uniones de calcio. Estas proteínas comparten homologías con otra glicoproteína, SwmA, que también posee zonas de unión a calcio y es requerida en *Synechococcus* para su desplazamiento (Adams, 1999).

Esta teoría es apoyada por micrografías que muestran una capa de fibrillas en la pared celular de especies del género *Oscillatoria* sp. entre la membrana exterior y la capa de peptidoglicanos, dispuestos helicoidalmente alrededor del filamento en un ángulo de aproximadamente 30° con respecto al eje longitudinal del filamento (Adams *et al.*, 1999) (Figura 13).

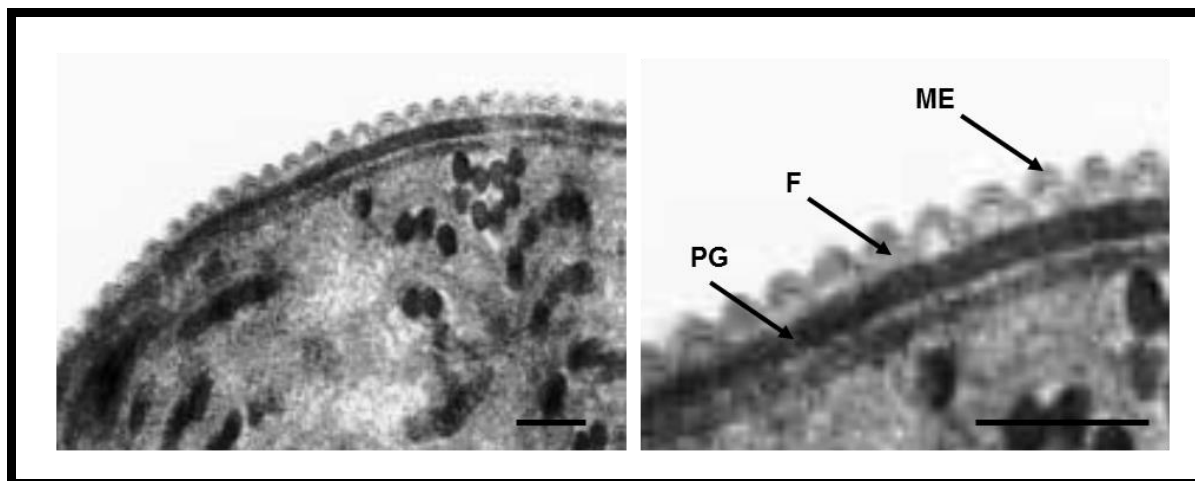


Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión de secciones transversales de *Oscillatoria* sp. Las ondulaciones en la pared celular son causadas por la presencia de la capa fibrilar (F) entre el peptidoglicano (PG) y la membrana externa (ME) (Adaptado de: Adams *et al.*, 1999).

Siddiqui y colaboradores (2001) ha sido sometido a un análisis matemático a este modelo donde las ondas peristálticas transversales, producen una fuerza para propulsar la bacteria en la dirección opuesta a la de la onda viajera. Llegaron a la conclusión de que el modelo podría generar fuerza suficiente para propulsar la célula a una velocidad realista y con un nivel de consumo de energía mucho menor que la velocidad probable del organismo por generada por energía metabólica. En un modelo en el que la matriz fibrilar genera ondas de superficie, el limo juega un papel pasivo (Read *et al.*, 2007).

En el caso de *Nostoc* se especula que antes de la evolución de hormogonios, esta cianobacteria era permanentemente móvil y empleaba una matriz de fibrillas paralelas del tipo visto en *Oscillatoria* sp. (Read *et al.*, 2007), pero cuando la capacidad de formar hormogonios evolucionó, las fibrillas ya no eran necesarias y sin embargo se siguen conservando. La respuesta a esto puede encontrarse en el efecto que las fibrillas tienen en superficie. Cuando se ve en sección transversal, la membrana que cubre cada fibrilla aparece en forma de arco. Si se supone que es un semicírculo de diámetro D , a continuación, por la geometría simple, es posible calcular el aumento de la superficie de la superficie que cubre la fibrilla, en comparación con un plano sin fibrillas; este valor en las células analizadas es 57%. Sin embargo, en especies como *N. punctiforme* las fibrillas no son paralelas, por lo que esto aumenta aún más el área de superficie.

Para muchas bacterias en el medio ambiente natural, crecimiento está limitado por la disponibilidad de nutrientes. La absorción de nutrientes en bacterias gram-negativas se produce a través canales de proteínas conocidos como porinas (Nikaido, 2003). La

transcripción de determinados genes relacionados con las porinas aumentan bajo la falta de nutrientes (Rippka *et al.*, 1979) y en respuesta, por ejemplo, a una disminución de fosfatos (von Krüger *et al.*, 2006) o por estrés osmótico (Kaeriyama & Machida, 2006). Un aumento en el número de moléculas de porina en la membrana es por lo tanto una importante respuesta a la limitación de nutrientes, y por lo que cualquier aumento en el área superficial de la superficie, con un aumento concomitante en las porinas, puede ser beneficioso. No todo el área de superficie adicional de la membrana será accesible para la absorción de nutrientes porque, como la hendidura entre las fibrillas disminuye en anchura a medida que se acerca la capa de peptidoglicano, el radio de un ion particular limitará su acceso a las porinas en esa región de la membrana. Sin embargo, es probable que sea una ventaja selectiva para las bacterias que aumentan el área de su superficie, particularmente en ambientes oligotróficos (Read *et al.*, 2007).

El desplazamiento tipo *gliding* necesita de una superficie para poder realizarse. No obstante, los fotobiontes presentes en el talo liquénico se encuentran en un medio acuoso por el que se mueven hasta alcanzar la hifa del hongo liquenizado. Esto implicaría otro modo de desplazamiento, compatible con el mecanismo para el movimiento en superficie, que permita a los fotobiontes “nadar” en interior del talo guiados por la lectina fúngica hasta las hifas del micobionte sobre las cuáles también pueden desplazarse en caso de ser necesario. Por tanto, siguiendo la línea de esta hipótesis, el desplazamiento realizado por *Nostoc* hacia el hongo liquenizado, no dependería de órganos periféricos sino de orgánulos citoplasmáticos.

Aunque el citoesqueleto no ha sido muy estudiado hasta el momento en células procariotas, la presencia de actina o proteínas similares ha sido reportada tanto en bacterias (Jones *et al.*, 2001; Dye *et al.*, 2005; Gitai *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 2008) como en cianobacterias (Guerrero-Barrera *et al.*, 1996; Usmanova *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2007), participando en el mantenimiento de la célula (Erickson, 2001; Vollmer, 2006), segregación de cromosomas o división celular (Defeu & Grauman, 2004). Sobre esta base, cabe destacar los estudios con *M. xanthus* de Mauriello y colaboradores (2010) donde han determinado que la asociación entre filamentos rígidos del citoesqueleto con complejos de adhesión en la superficie (Wozniak *et al.*, 2004; Mignot, 2007; Mignot *et al.*, 2007) potencia la motilidad de estas bacterias de modo muy similar a la migración celular en eucariotas.

7. IMPLICACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL DESPLAZAMIENTO DE LOS CIANOBIONTES

Las células eucarióticas contienen un complejo y dinámico citoesqueleto, requerido para mantener la forma de la célula, para el movimiento del ADN y orgánulos así como para la división celular. El citoesqueleto eucariótico contiene tres componentes mayoritarios: tubulina, actina y proteínas de filamentos intermedios (Health, 1994). La ausencia de citoesqueleto ha sido considerada sello común distintivo de procariotas. Sin embargo, actualmente existen numerosos artículos que hablan de la existencia de fibras y túbulos en procariotas. Han sido visualizados por microscopía electrónica estructuras citoplasmáticas de tipo filamentoso en al menos 70 especies diferentes de eubacterias, muchas de las cuales pertenecían al grupo de las cianobacterias o espirochetes (Bermudes *et al.*, 1994). La composición de la mayoría de estas estructuras es aún desconocida (Vollmer, 2006).

La introducción de modernas técnicas de localización de proteínas, en combinación con la secuenciación de ADN, ha permitido la identificación de elementos del citoesqueleto bacteriano en modelos bacterianos tales como *E. coli* o *B. subtilis*. En 1991, se publicó por primera vez la existencia de una estructura de tipo anillo, esencial para la división celular, denominada como proteína FtsZ en *E. coli* (Bi & Lutkenhaus, 1991). En la actualidad se sabe que esta proteína está presente en la mayoría de las especies bacterianas y que presenta una estructura similar a la presente en la tubulina eucariótica. En 1992, se predijo que varias proteínas bacterianas (DnaK, FtsA, ParM y MreB) podrían adoptar una conformación tridimensional similar a la actina (Bork *et al.*, 1992). Recientes estudios filogenéticos han identificado más de 20 subgrupos de actina homólogas bacterianas (Derman *et al.*, 2009) (Figura 14). Muchas de estas actinas bacterianas están codificadas en plásmidos extra-cromosómicos, pero la mayoría de especies bacterianas con morfologías esféricas también codifican actinas homólogas (Daniel & Errington 2003). Actualmente se sabe que la actina, tubulina y proteínas de filamentos intermedios presentes en las bacterias, comparten las principales características estructurales con sus análogas eucariotas (Carballido, 2006; Vollmer, 2006). Como en eucariotas, el citoesqueleto bacteriano es requerido para el crecimiento y división celular, la segregación del ADN, orientación de las proteínas y el alineamiento de los orgánulos. Sin embargo, algunos elementos del citoesqueleto han sido encontrados en bacterias y no en eucariotas (Errington, 2003; Graumann, 2004; Lewis, 2004; Löwe *et al.*, 2004; Gitai, 2005; Michie & Löwe, 2006).

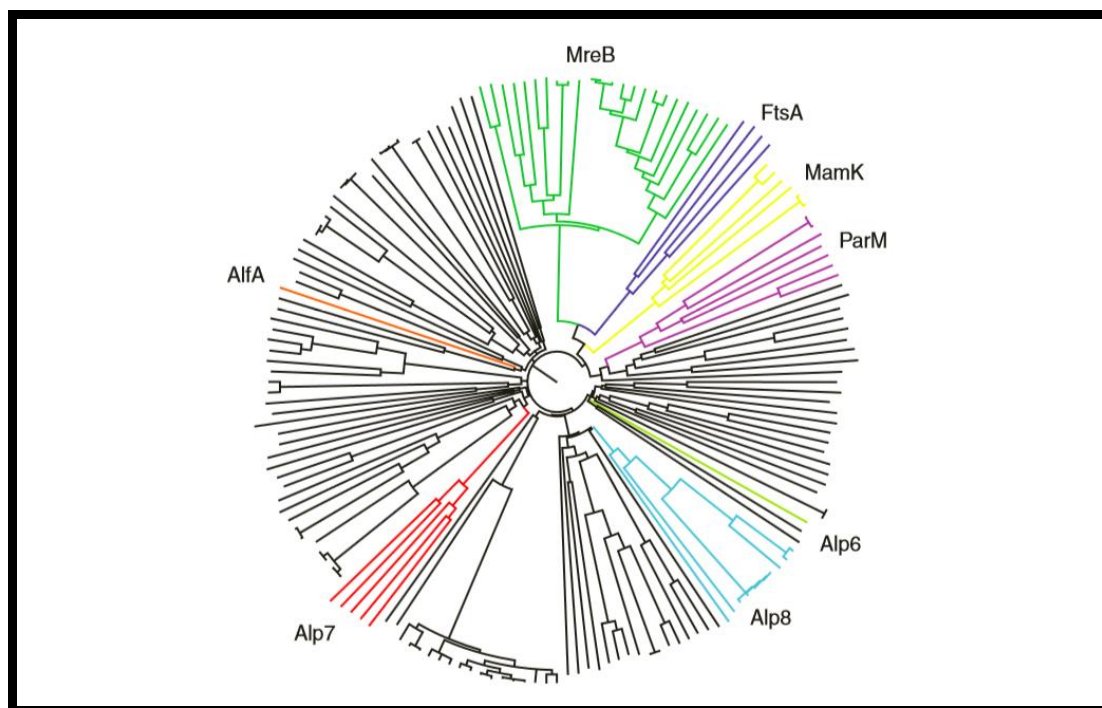


Figura 14. Árbol filogenético de las actinas homólogas bacterianas que se han identificado hasta la fecha sobre la base de homología de secuencia. Las subfamilias que se ha demostrado experimentalmente que son capaces de polimerizar son etiquetadas y coloreadas (Adaptado de: Derman *et al.* 2009).

7.1. Organización de los filamentos de actina

La actina es una de las proteínas más abundantes y conservadas que se encuentran en todas las células eucariotas (Korn *et al.*, 1987). Las células eucariotas expresan distintas isoformas de la actina tales como: actina α , que aparece en estructuras contráctiles, actina β , en el borde de expansión de las células que emplean la proyección y estructuras celulares como método de motilidad y actina γ , en los filamentos de las fibras de estrés (Lodish *et al.*, 2005). Se encuentra de forma convencional como actina globular o actina-G, con un peso de 43 kDa, donde cada molécula contiene un ion Mg^{2+} y una molécula de ATP o ADP unida (Alberts *et al.*, 2006). Los monómeros de actina ensamblan espontáneamente para formar polímeros filamentosos denominados actina-F. Aunque existen cuatro estados de actina (actina-G-ATP, actina-G-ADP, actina-F-ATP, actina-F-ADP), la actina-G-ATP y la actina-F-ADP, son mayoritarias en la célula (Alberts *et al.*, 2006).

Si bien la actina-G tiene apariencia globular, la cristalografía de rayos X muestra que está constituida por dos lóbulos separados por una profunda hendidura. Los lóbulos y la hendidura constituyen el llamado pliegue ATPasa, lugar donde el ATP y el Mg^{2+} se unen. El ensamblaje de la actina-G en actina-F es acompañado de la hidrólisis de ATP en ADP + P_i (Lodish *et al.*, 2005).

La polimerización de la actina es un proceso altamente regulado y controlado tanto por la unión de nucleótidos y la hidrólisis como por la acción de una serie de proteínas de unión a la actina que pueden estabilizar o desestabilizar los filamentos (Korn *et al.*, 1987; Schmidt & Hall, 1998; Cooper & Schafer, 2000). Los filamentos se polimerizan de forma no covalente a partir de ambos extremos, con diferentes afinidades para los monómeros en cada extremo (Carballino-López, 2006). Esto da lugar a una polaridad en el filamento, de forma que el extremo que posee el monómero de actina con el dominio de unión al ATP expuesto a la solución se denomina extremo (-) o de crecimiento lento. Por el contrario, el extremo opuesto donde la hendidura de unión al ATP del último monómero hace contacto con el monómero de actina vecino (y no a la solución), es denominado extremo (+) o de crecimiento rápido. Es necesaria la existencia de una concentración crítica de monómeros de actina para que se produzca la formación de actina-F. Cuando se alcanza la concentración crítica, lo primero que se observa es un fenómeno conocido como nucleación, donde algunos monómeros de actina-G se agrupan formando un pequeño núcleo. A menudo los sitios de nucleación están ligados a localizaciones de la membrana celular sobre la que se ancla el extremo (+) de los microfilamentos. Los microfilamentos tienen entre 3-6 nm de diámetro) y rara vez se producen de forma aislada dentro de la célula, sino más bien, en los agregados entrecruzados y haces (Carballino-López, 2006).

A continuación tiene lugar la fase de elongación o alargamiento del microfilamento, en la cual los nuevos monómeros se incorporan al grupo inicial creado en la primera fase. Esta fase es reversible y se desarrolla hasta que la concentración de la actina-G libre alcanza el punto crítico. Alcanzado ese punto, denominado como estado estacionario, la pérdida de subunidades en el extremo (-) y la ganancia equivalente en el extremo (+) da lugar a un efecto conocido como recambio rotatorio o *treadmilling* (Cleveland, 1982). Esta rotación es una consecuencia de la actividad de la ATPasa de la actina (Korn *et al.*, 1987). Durante la fase de latencia y polimerización, el ATP se fija sobre el sitio de unión de la cada monómero de actina-G. La hidrólisis de ATP en ADP + P_i provoca la polimerización, mientras que en el extremo opuesto la actina-F libera moléculas de ADP (Maciver *et al.*, 1991) y unir nuevamente ATP, que se encuentra en mayor concentración en el citoplasma, liberándose del filamento y originando de nuevo actina-G. Las variaciones en las concentraciones moleculares, las proteínas que determinan los procesos de nucleación y elongación y la posición o longitud de los microfilamentos, convierten al microfilamento en una estructura altamente dinámica (Alberts *et al.*, 2006).

Numerosos métodos son utilizados para estudiar la organización de las redes de actina a nivel microscópico, incluidos los métodos estructurales (Landis & Reese, 1983) y anticuerpos contra las isoformas de actina (Matus *et al.*, 1982; Kuczmarski & Rosebaum, 1979; Ab-El-Basset & Fedoroff, 1994). Muchos investigadores utilizan faloidina, péptido de unión a actina, conjugado con diversas moléculas fluorescentes (Ab-El-Basset & Fedoroff, 1994; Fischer *et al.*, 1998). La faloidina es un pequeño péptido bicíclico que consta de siete aminoácidos con un peso molecular de 789 kDa. Proviene del hongo Basidiomicete *Amanita phalloides* y se une tanto a la actina filamentosa grandes o pequeñas (actina-F) con alta afinidad, pero a diferencia de los anticuerpos, no se une a actina monomérica (actina-G) (Wulf *et al.*, 1979).

Debido a la abundancia de filamentos de actina, la señal producida por dicho péptido unido a un fluorocromo es de gran intensidad (Hillberga *et al.*, 2006), lo que permite relacionar la fluorescencia medible con la cantidad de filamentos de actina presentes, empleando cantidades saturantes de faloidina. Así mismo, la unión de la faloidina a los filamentos de actina es de gran ayuda a la hora de visualizar donde ocurren los procesos de polimerización/despolimerización que ocurren durante el desplazamiento celular, cuyo movimiento depende del citoesqueleto.

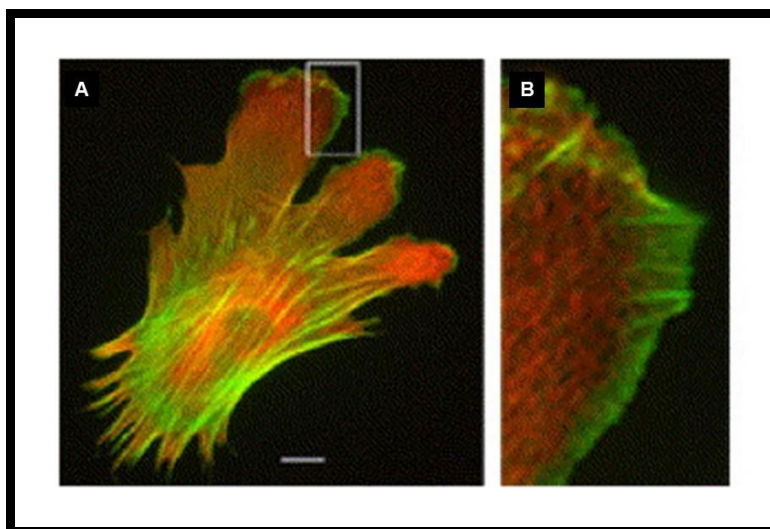


Figura 15. Micrografía de fibroblastos humanos donde la F-actina ha sido marcada con faloidina unida a un fluoróforo conocianato de fluoresceína (ITCF) (Adaptado de: Hillberga *et al.*, 2006).

La capacidad de estabilizar los filamentos de actina y atravesar membranas celulares, hacen de la faloidina un potente tóxico capaz de alterar la dinámica del citoesqueleto. Su estructura química contiene aminoácidos poco frecuentes como la Cys3-Pro(OH)4-Ala5-Trp6, el cual es esencial para su toxicidad (Oda *et al.*, 2005). Otras toxinas

bloquean/inhiben el ensamblaje o desestabilizan los filamentos. Estos compuestos se unen a la actina-G bien en la hendidura donde tienen lugar la unión de los nucleótidos o bien en el extremo (+) de la actina-F (Spector *et al.*, 1999; Allingham *et al.*, 2006). Para provocar la despolimerización de citoesqueleto de actina se han utilizado clásicamente las citocalasinas, metabolitos fúngicos que actúan a nivel del extremo (+) de la actina-F, bloqueando la entrada y salida de actina-G. Las latrunculinas, son potentes inhibidores de la formación de F-actina inhiben o bloquean el ensamblaje de los monómeros de actina y se obtienen en su mayoría a partir de esponjas de la familia *Latrunculiidae* (*Negombata* y *Latrunculina* sp.) (El-Sayed *et al.*, 2006).

La secuencia de aminoácidos presente en las actinas se encuentra altamente conservada en eucariotas (por ejemplo, hay 100 % de identidad entre humanos y la actina del músculo esquelético de pollo (Erickson, 2007) y 88 % de identidad con actina de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). Los principales criterios funcionales utilizados originalmente para identificar actinas incluían la capacidad de polimerizar espontáneamente de los filamentos o de estimular la actividad ATPasa de la miosina. Las actinas más convencionales también pueden unirse DNasa I y drogas tales como las citocalasina, faloidina, o latrunculina (Carballino-López, 2006).

Sin embargo, hay una subfamilia emergente de actinas altamente divergentes que comparten similitud de secuencia significativa pero con una homología y especificidad de unión al ligando limitada. En 1992, Bork y colaboradores informaron acerca de un gran grupo de proteínas funcionalmente muy diferentes (la chaperona bacteriana DnaK [Hsp70] (Wetzstein *et al.*, 1992), la proteína de división celular FtsA (Tormo & Vicente, 1984), la proteína de estabilidad del plásmido Parm [STBA] (Min *et al.*, 1988), y el determinante de la forma celular MreB (Doi *et al.*, 1998). Con un porcentaje muy limitado de secuencia de aminoácidos de identidad / similitud (por ejemplo, sólo 11 % de similitud entre Parm y actina y un 15 % de identidad entre MreB y actina (mucho menos de la identidad 20 % utiliza generalmente como una línea de base para establecer homólogos), contienen cinco motivos de secuencia conservada que determinan una estructura tridimensional similar a la de la actina. Aunque las principales funciones biológicas de estas proteínas son diversas y parecían tener poco que ver con el citoesqueleto, diez años después de la predicción de Bork (1992), donde se pronosticó un origen común para proteínas tales como, actinas, hexoquinas, proteínas de choque térmico y porcariotas como MreB todas ellas con un dominio de ATPasa propio de estructura tridimensional conocida, dos de estas proteínas bacterianas, MreB y Parm, mostraron ser homólogas estructurales y funcionales de la actina. Las proteínas MreB están más cerca de actinas en el tamaño general y la topología

que cualquier otro miembro de la superfamilia, mientras que los plásmidos que codifican proteínas Parm son más pequeños y divergentes pero también es homólogos de actina (Shaevitz & Gitai, 2010) (Figura 16).

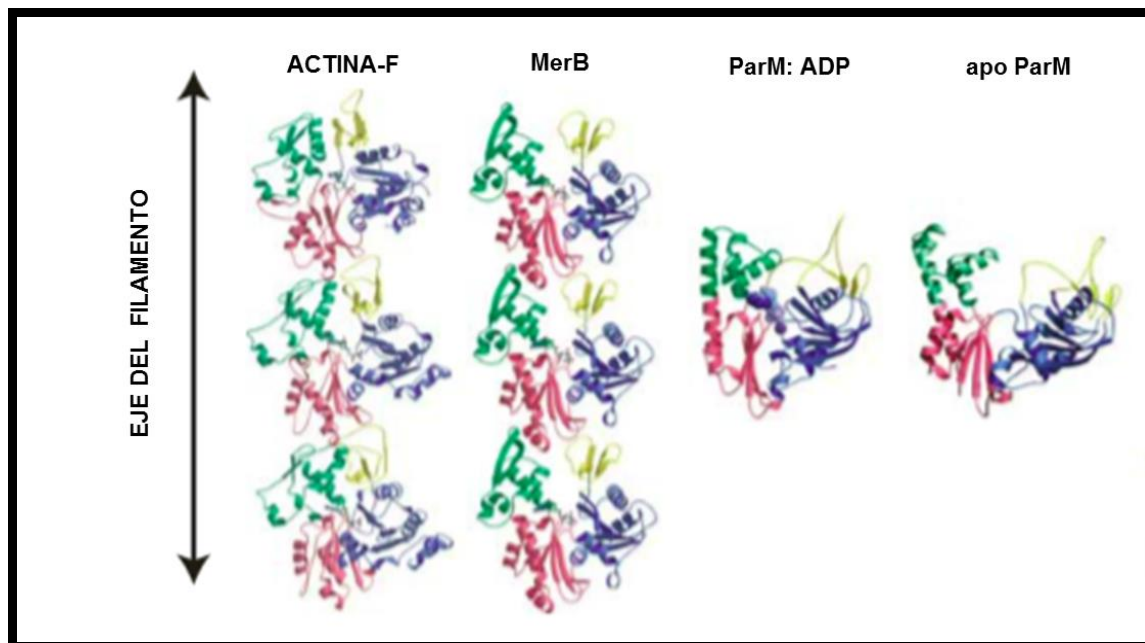


Figura 16. Estructura de la actina-F (Holmes *et al.*, 1990), filamentos MreB (van den Ent *et al.*, 2001) de la bacteria *Termotoga maritima* y ParM (van den Ent *et al.*, 2002). ParM: ADP monómero en conformación cerrada y apo ParM monómero en conformación cerrada (Adaptado de: Shaevitz & Gitai, 2010).

7.2. MreB o actina bacteriana

La proteína MreB fue identificada por primera vez como una proteína envuelta en la regulación de la forma celular en *Escherichia coli* en los años 80 (Doi *et al.*, 1988). Desde entonces una gran diversidad de homólogos de MreB han sido descubiertos en bacterias y archaeas (Ettema *et al.*, 2011). Al menos un homólogo de MreB se encuentra en la mayoría de las bacterias no esféricas (Daniel & Errington, 2003). Las excepciones a esta regla se componen de un número de patógenos de plantas y animales incluyendo micoplasmas, micobacterias, y *Rhizobiae*. Hay también varias bacterias esféricas, como las cianobacterias y *Planctomycetes* que tienen homólogos de MreB. Codificada en los cromosomas de diferentes especies, MreB puede participar en diversas actividades celulares (Daniel & Errington, 2003; Gitai *et al.*, 2004). Los homólogos de MreB han sido implicados en casi todos los procesos espacialmente aquellos relacionados con la organización celular, incluyendo el crecimiento, la morfogénesis, la polaridad, el posicionamiento de orgánulos, división, diferenciación, así como segregación cromosómica, la replicación, y decatenación (Carballido, 2006). En el año 2001 se demostró que MreB de *B. subtilis* (Jones *et al.*, 2001) y

de *Thermotoga marítima* (van den Ent *et al.*, 2001) es capaz de polimerizar *in vivo* formando filamentos lineales de un modo similar a la actina de eucariotas (Figura 17).

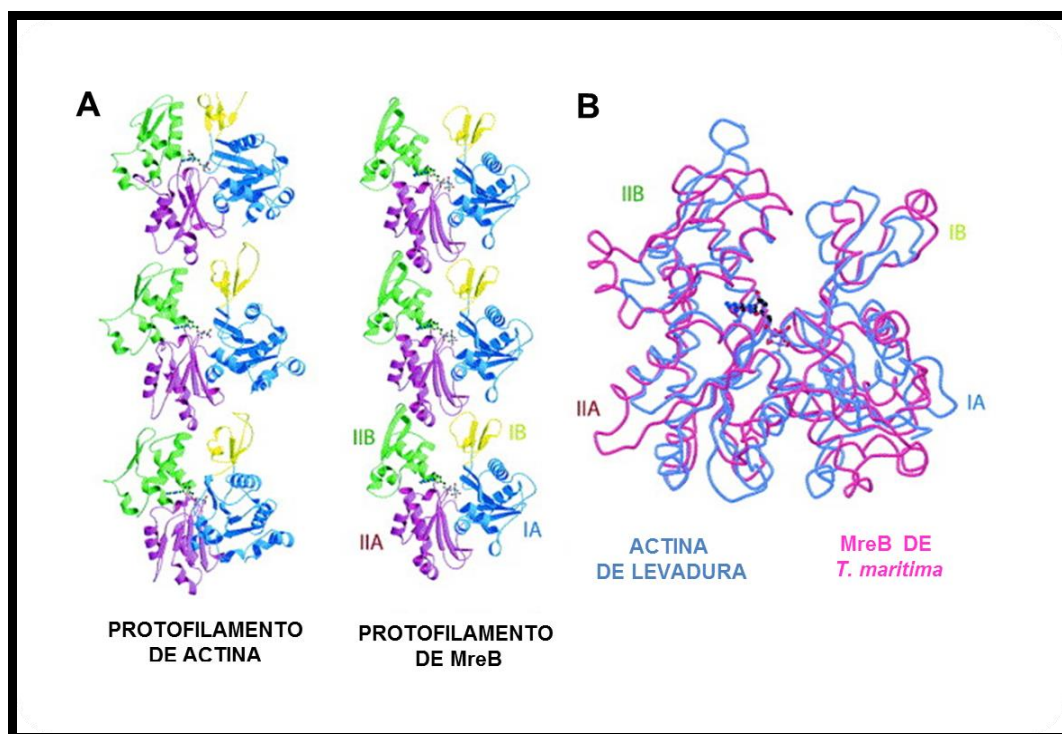


Figura 17. Comparación estructural de actina bacteriana y de eucariotas. (A) MreB consiste en filamentos similares a una hebra (protofilamento) de actina-F. (Adaptado de: Löwe *et al.*, 2004). (B) Superposición de MreB de la bacteria *T. marítima* (azul) con actina de levadura (rosa). A pesar de tener una identidad de secuencia muy baja, las dos proteínas tienen esencialmente el mismo plegamiento con una identidad de secuencia de 16 % (Adaptado de: Kruse & Grendes, 2005).

Los homólogos de MreB comparten la misma base de la superfamilia actina, y hasta la fecha, todos los que se han encontrado son capaces de polimerizar. No obstante, debido a la diversidad en el número y secuencia de homólogos de MreB, esta proteína no puede ser tratada como una sola entidad y es importante especificar qué homólogo se está discutiendo y su contexto específico. La mayor parte del trabajo estructural y bioquímico en MreB se ha realizado en de *T. marítima*, mientras que las propiedades *in vivo* de MreB mejor caracterizadas se han estudiado en *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*, y *E. coli* (Defeu Soufo & Graumann, 2003; Gitai *et al.*, 2005; Kruse *et al.*, 2003, 2006).

Cuando se trata de dar una visión de integral de la cinética de polimerización *in vitro* de MreB, resulta particularmente complicado debido a que los diferentes grupos de experimentales han producido resultados variables con diferentes construcciones. Hasta el momento, los mecanismos bioquímicos de polimerización y la dinámica de MreB siguen siendo un área activa de investigación. Por su secuencia, MreB es la proteína más

estrechamente relacionada con la actina de todas las proteínas de la familia actina aunque con pequeñas diferencias tanto en el sitio de unión de nucleótidos como los residuos que conforman la interacción monómero-monómero dentro de un protofilamento (Shaevitz & Gitai, 2010). Las diferencias en la interfaz de monómero-monómero son interesantes ya que en ambos casos debe haber evolucionado de forma concomitante para retener la polimerización.

La separación lateral de monómeros a lo largo de un protofilamento MreB es 5,1 nm con una alta concentración de residuos hidrófobos en la interfaz de monómero-monómero, produciendo una interacción de unión fuerte (Shaevitz & Gitai, 2010). La polimerización *in vitro* de MreB a partir de proteínas purificadas de *T. maritima* (van den Ent *et al.*, 2001) es fuertemente dependiente de la temperatura y la concentración de diferentes iones en la solución. La concentración crítica en este caso es de 3 nM, cien veces más pequeña que la de la actina. Así mismo, MreB puede utilizar ATP o GTP como sustrato igualmente bien, a diferencia de otras proteínas tales como F-actina que únicamente utiliza ATP (Wen *et al.*, 2002; Esue *et al.*, 2006).

Posteriores trabajos centrados en la misma proteína determinaron un comportamiento diferente (Bean & Amann 2008). Se encontraron dos fases de polimerización, una que utiliza cationes divalentes y otra que no lo hace. Estas fases se podrían comparar con la fase de nucleación y el crecimiento del polímero presentes en la formación de filamentos de actina. La proteína es menos sensible a la temperatura que los reportados previamente y la hidrólisis de ATP fue rápida, lo que implica que *in vivo* MreB polimerizado está en un estado ADP-enlazado. Además, los autores midieron la concentración crítica para la polimerización en presencia de ATP y ADP y encontraron estos dos valores cerca uno del otro, requisito para *treadmilling* o recambio rotatorio. El comportamiento cinético de esta enzima es drásticamente diferente en *B. subtilis* (Mayer & Amman, 2009). MreB requiere concentraciones milimolares de cationes divalentes para polimerizar y se ve favorecido por un pH bajo, y sin embargo es inhibido por las sales monovalentes y bajas temperaturas. Se une e hidroliza ATP y GTP, pero, sorprendentemente, no requiere nucleótidos a polimerizar. En este caso, la concentración crítica para la polimerización fue de 900 nM, independientemente de la presencia o ausencia de nucleótidos.

En la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120, MreB es importante para el mantenimiento de la forma de las células (Hu *et al.*, 2007), con una localización polar, el mecanismo que subyace el control de la forma aún no está claramente establecido.

Considerando que F-actina juega un papel de andamiaje celular en eucariotas, la forma de las bacterias no parece ser directamente dependiente de MreB (Chastanet & Carballido-López, 2012). En la mayoría de las células bacterianas, la pared celular, una malla macromolecular compuesta principalmente por peptidoglicanos, actúa como un exoesqueleto (Vollmer & Seligman, 2010) que envuelve a toda la célula y le proporciona la integridad física y la resistencia mecánica. Consistentemente, la eliminación de los peptidoglicanos conduce a la hinchazón o redondeamiento de las células. Este hallazgo indica que la pared celular es generalmente necesaria y suficiente para mantener la forma celular. Los trabajos en *E. coli* y *B. subtilis* sugieren que la función mecánica de los filamentos MreB puede contribuir a este proceso (Defeu & Graumann, 2010; Wang, 2010) (Figura 18). Esta comprobación sistemática está revelando un número creciente de ejemplos que implican a MreB en distintos procesos celulares, tales como la motilidad celular, la producción de pilli o la polaridad celular (Cowles & Gitai, 2010; Mauriello *et al.*, 2010; Chastanet & Carballido-López, 2012).

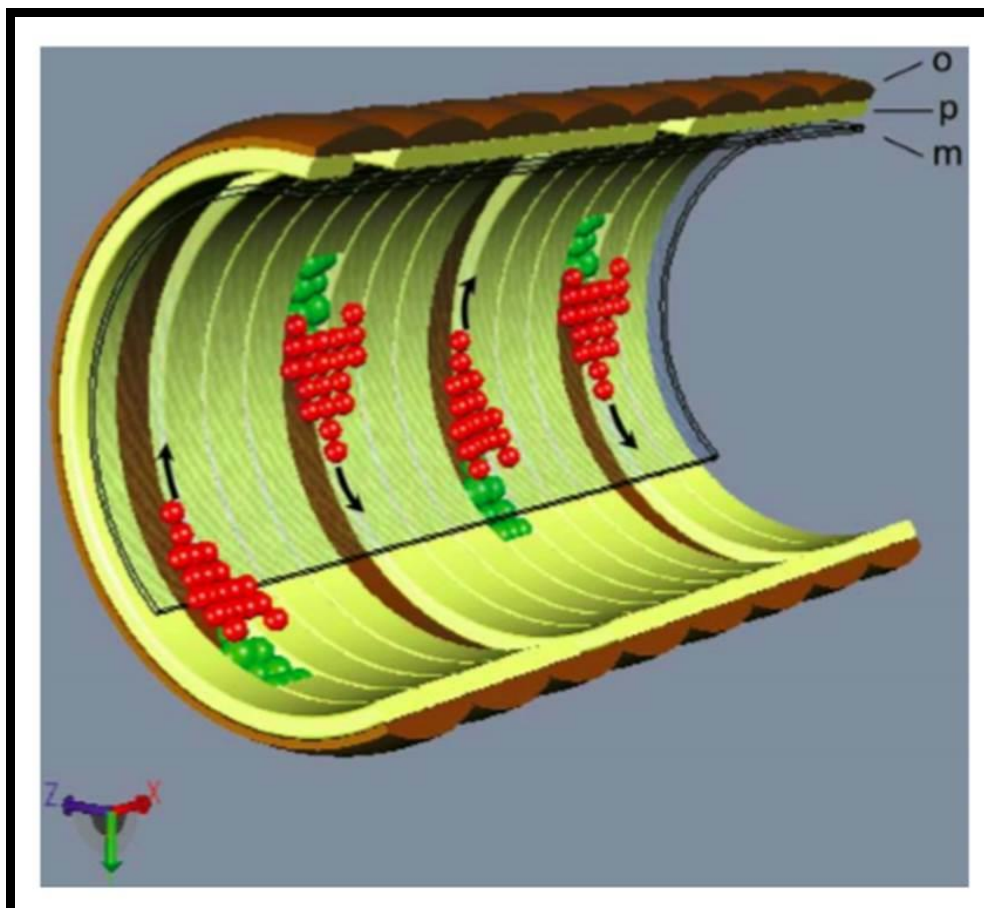


Figura 18. Modelo para la biosíntesis de la pared lateral en *B. subtilis*. Filamentos MreBs (rojo) y complejos de biosíntesis de peptidoglicanos (verde) implicados en la elongación de la pared lateral en la membrana (m), se mueven a lo largo de las pistas periféricas perpendiculares al eje longitudinal de la célula. Estos complejos de elongación son capaces de moverse en ambas direcciones (flechas). La inserción de bandas circunferenciales de nuevos peptidoglicanos (p, amarillo) aparece en el exterior de la membrana bajo las hebras antiguas (marrón) (Adaptado de: Chastanet & Carballido-Lopez, 2012).

7.3. ATPasas, motores moleculares del desplazamiento

Las células eucariotas presentan los denominados motores del citoesqueleto (dineínas, kinesinas y miosinas) capaces de obtener energía de la hidrólisis del ATP para realizar diversas tareas celulares. Cada uno de estos motores es una superfamilia que contiene múltiples clases de proteínas especializadas. La dineína es, junto con la kinesina, la proteína motora más importante asociada a los microtubulos, mientras que las miosinas actúan exclusivamente sobre actina polimerizada (Wickstead & Gull, 2011). Los procariotas en cambio, presentan unas proteínas conocidas como WACA, *Walker A cytoskeletal ATPases* o ATPasas andadoras del citoesqueleto (Michie & Lowe, 2006). Las proteínas WACA son una familia diversa de las ATPasas (Koonin, 1993), que a su vez son parte de la superclase extremadamente grande de proteínas P-bucle que incluye proteínas de reconocimiento, proteínas Rho/Ras, GTPasas y motores del citoesqueleto (Leipe *et al.*, 2002).

La miosina es una ATPasa que convierte la energía química en movimiento dirigido valiéndose de modificaciones conformacionales de su estructura (Cameron *et al.*, 2003). Esta proteína se presenta en muchas formas y tamaños, donde más de 11 clases de miosina han sido identificadas, y se prevé que existan más tipos (Mooseker & Cheney, 1995). De hecho, se ha reconocido en una forma u otra en todas las células eucariotas, lo que sugiere una evolución similar a la de la propia actina. Las miosinas son proteínas multiméricas formadas por una o varias cadenas pesadas o *heavy chains*. La región amino terminal de las cadenas forma un cabeza globular a la cual se asocia a dos o más cadenas ligeras o *light chains*. La cabeza es el dominio más conservado de las moléculas de las miosinas y es la región con mayor afinidad para actina y ATP, como consecuencia, la cabeza de las miosinas es la parte más involucrada en la conversión de la energía química del ATP en energía mecánica, transducida en movimiento por el filamento de actina (Ray *et al.*, 1993; Bement & Mooseker, 1993).

La mayor parte del conocimiento del funcionamiento cinético de las miosinas en la contracción deriva del estudio de la miosina II del músculo esquelético. De manera general, la hidrólisis de ATP por parte de las moléculas de miosina II provoca la fijación de la cabeza de la miosina sobre el filamento de actina, mientras que la fosforilación del ADP provoca su separación (Maillet, 2002). La consecuencia final es el desplazamiento de las miosinas desde el extremo (-) hacia el (+) de los filamentos de actina (Figura 19).

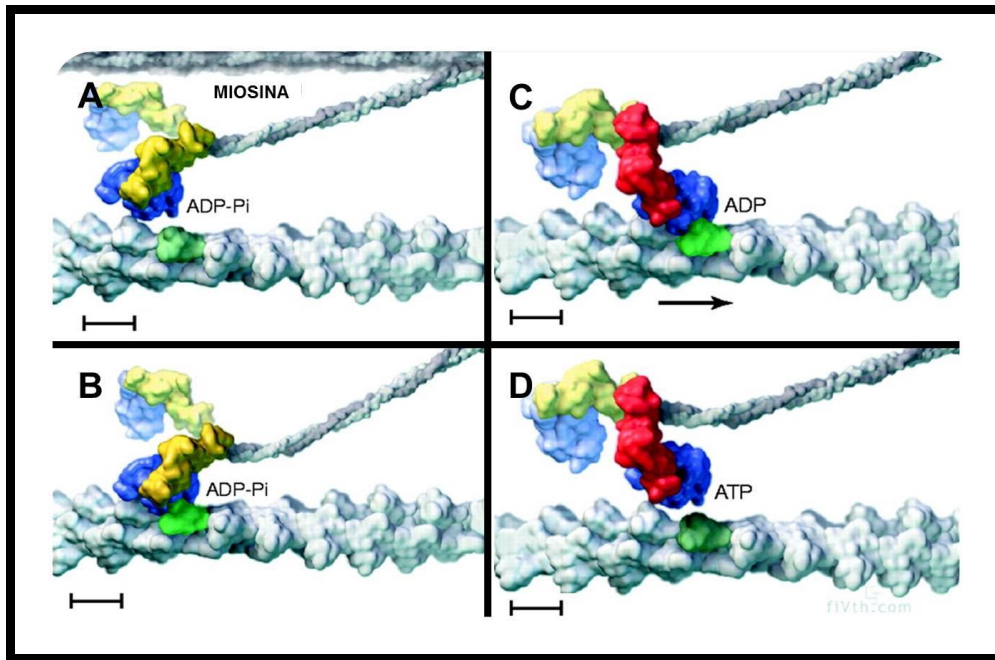


Figura 19. Modelo del ciclo de la motilidad de la miosina del músculo (A): En el estado ADP-Pi-enlazado, el núcleo catalítico se une débilmente a la actina formando el complejo actomiosina (B): Las dos cabezas de miosina actúan de forma independiente, y sólo una se une a la actina a la vez. (C): El acoplamiento con la actina provoca la liberación de fosfato desde el sitio activo. (D): El ATP se une a la cabeza de la miosina y el complejo actomiosina se disocia (Vale & Milligan, 2000).

Aunque el aspecto mejor conocido es su papel como componente de los filamentos de las células musculares, las miosinas también participan en el movimiento de muchas células como leucocitos móviles (Eddy *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003), fibroblastos (Maupin *et al.*, 1994; Kolega, 1998; Vicente-Manzanares *et al.*, 2008), desplazamiento y polarización de hongos patógenos (Schuster *et al.*, 2012) o plantas donde se unen a las superficies de los orgánulos e interactúan con microfilamentos de actina, que organizan y dirigen el movimiento intracelular (Shimmen, 2000).

En el caso de la motilidad bacteriana, se han encontrado organismos como *Spiroplasma* (Bardy *et al.*, 2003) cuyo desplazamiento es realizado por contracciones del citoesqueleto (Figura 20). *Spiroplasma melifera* se considera uno de los organismos más pequeños de vida libre existentes en la Tierra, cuyo genoma es la mitad que el de *E. coli*. Sorprendentemente, esta bacteria es móvil, aunque no flagelada. Carece de pared celular pero presenta un citoesqueleto interno unido a la membrana plasmática, compuesto por una única proteína de 59 kDa, la cual actúa como motor, provocando contracciones lineales interaccionando con la membrana (Trachtenberg & Gilad, 2001). Aunque actualmente está poco estudiada, esta estructura de motilidad representa un enfoque verdaderamente novedoso para la motilidad usando lo que parece ser un complemento de genes mucho menor que el requerido para flagelación (Bardy *et al.*, 2003).

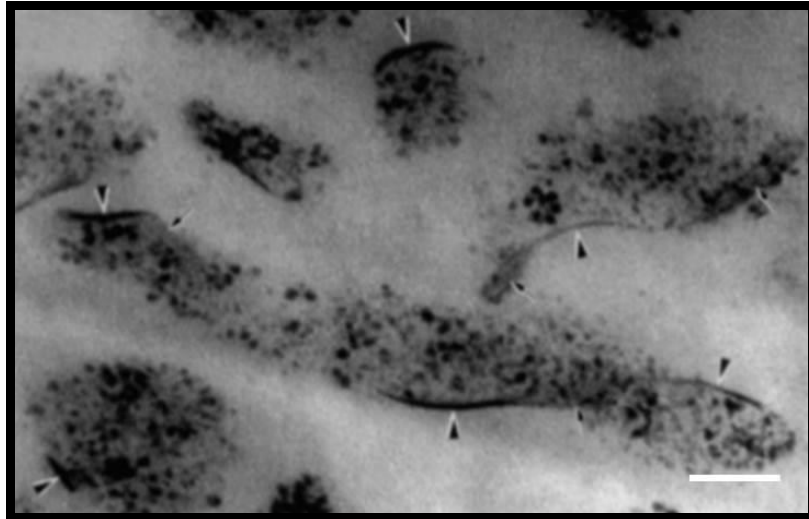


Figura 20. Micrografía de transmisión del citoesqueleto contráctil de *S. melliferum* BC3. Todos los componentes celulares han sido extraídos y sólo el citoesqueleto y los ribosomas fueron preservados. La trayectoria helicoidal del citoesqueleto es claramente visible en secciones transversales (puntas de flecha) y las secciones tangenciales (flechas) (Adaptado de: Trachtenberg, 1998)

Un modelo propuesto para desplazarse en *Flavobacterium johnsoniae* y organismos relacionados se basa en proteínas específicas ancladas en la membrana citoplasmática y externa. El movimiento de estos organismos es impulsado por un mecanismo denominado de trinquete que propulsa a las células hacia adelante (Figura 21).

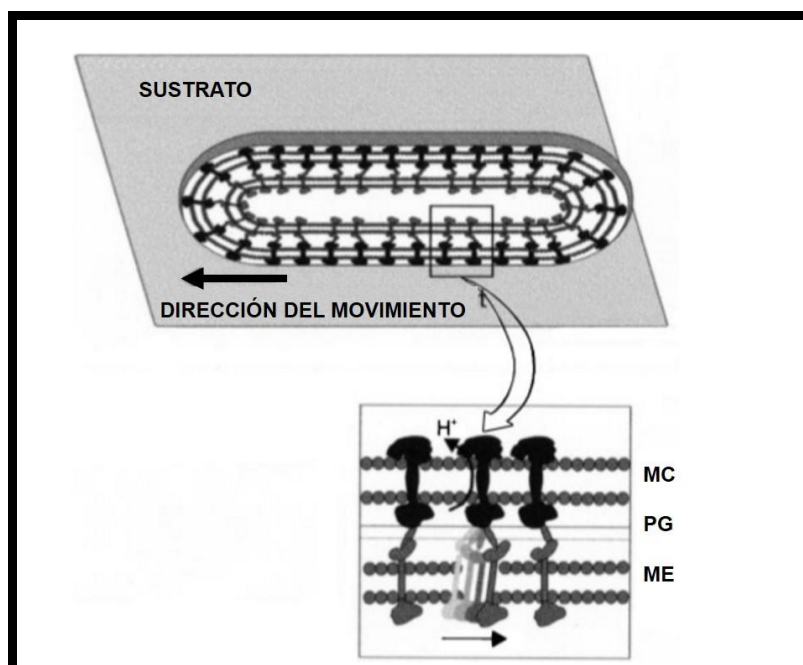


Figura 21. Representación esquemática de la estructura tipo trinquete que participa en la motilidad de *Flavobacterium* y organismos relacionados. Las proteínas en la membrana citoplasmática (MC) impulsan a las proteínas de membrana externa (ME) a lo largo de unos “carriles” que están anclados a los petidoglicanos (PG). La fijación temporal de las proteínas de ME al sustrato produce el movimiento celular. (Adaptado de: McBride, 2001).

Las proteínas de la membrana externa podrían estar ancladas a los peptidoglicanos de la pared, formando pistas o carriles que facilitan el desplazamiento de dichas proteínas. Varios genes han sido implicados en el deslizamiento de *F. johnsoniae* incluyendo tres (*gldA*, *gldB*, *gldD*) (Agarwal *et al.*, 1997; Hunnicutt & McBride, 2000; Hunnicutt & McBride, 2001; Kempf & McBride, 2000) cuyos productos forman un transportador de ATP, necesario para el movimiento (Hunnicutt *et al.*, 2002). Aunque, la función exacta de cualquiera de estas proteínas en el desplazamiento es desconocida hasta el momento (Bardy *et al.*, 2003), GLDA presenta una similitud de secuencia con proteínas transportadoras que se unen a ATP (ABC) (Agarwal *et al.*, 1997). Estas proteínas, comunes en las bacterias, arqueas y eucariotas, utilizan la hidrólisis de ATP como fuente de energía para el transporte de sustancias a través de una o más membranas en de las células (Fath & Kolter, 1993; Young & Holland, 1999; Holland & Blight, 1999). GLDA es similar a las subunidades hidrolizantes de ATP, aunque no tiene ninguna región hidrófoba obvia y probablemente requiere la presencia de proteínas integrales de membrana para formar un transportador funcional. (Hunnicutt *et al.*, 2002).

Las bacterias Gram-negativas utilizan proteínas que hidrolizan ATP para conseguir la energía necesaria para el funcionamiento de proteínas retractiles como el sistema Pili de tipo V (Chiang *et al.*, 2008). El sistema está típicamente asociado con la adherencia y la motilidad tipo *twiching*, asociada a la superficie, pero en algunas bacterias también se ha demostrado que participa en la secreción de proteínas (Forsberg & Guina, 2007; Hager *et al.*, 2006; Kirn *et al.*, 2003; Kirn & Taylor, 2005; Kennan *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2007) o aparece en bacterias con movilidad gliding como *M. xanthus* (Wall & Kaiser, 1999). La dinámica de extensión/retracción de los centros del sistema Pili tipo V depende de dos ATPasas denominadas como PilB y PilB, donde PilB es necesaria para la extensión (Wall & Kaiser, 1999; Mattick 2002) mientras que PilT se requiere específicamente para la retracción (Merz & Sheetz, 2000). Las proteínas PilT forman un subgrupo de las ATPasas tipo II dentro de una familia más grande de ATPasas IV y de secreción hexaméricas, necesarias para el transporte de un conjunto diverso de proteínas solubles a través de la envoltura bacteriana en una amplia variedad de bacterias patógenas y ambientales (Planet *et al.*, 2001; Cianciotto, 2005).

Dentro de las cianobacterias, el género *Synechocystis* y en concreto la cepa PCC 6803, requiere de la proteína PilT para la motilidad celular (Bhaya *et al.*, 2000; Okamoto & Ohmori 1999), las mutaciones de los genes pil producen como resultado una pérdida completa de la motilidad y la adquisición de fenotipos con ausencia o presencia excesiva de pili (Yoshihara & Ikeuchi, 2004). Del mismo modo, el sistema pili de tipo V media la

formación de los pili en la superficie de hormogonios de *Nostoc punctiforme*, donde las mutaciones de los genes implicados alteran (Duggan *et al.*, 2007) reducen la competencia simbiótica.

Así mismo, estudios realizados con cianobacterias del género *Synechococcus* donde se han analizado las secuencias de los genes que codifican nueve subunidades de ATP sintasa, han determinado la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que contiene repeticiones internas relacionadas con las secuencias de la cadena pesada de la miosina (van WALRAVEN *et al.*, 1993).

8. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EN EL MOVIMIENTO DE LOS CIANOBIONTES

La adaptación al medio es un proceso esencial para la supervivencia de los organismos. Los sistemas que permiten a las células sentir y responder a una nueva situación se denominan sistemas de transducción de señales. Estos sistemas funcionan percibiendo la llegada de un estímulo externo y transmitiendo la información recibida al interior de la célula (Casino, 2008). A pesar de la gran variedad de estímulos y respuestas, se utiliza un número relativamente pequeño de estrategias moleculares para la transducción de señales. La fosforilación de proteínas en residuos específicos es una estrategia fundamental como vehículo de transmisión de señales. En eucariotas, la fosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina es el principal sistema de transducción de señales, mientras que en procariotas predomina un esquema diferente de fosforilación (West & Stock, 2001).

Los sistemas de dos componentes (TCSs) son los principales **sistemas de transducción** de señales en procariotas (Stock *et al.*, 1990) aunque también se encuentran en otros organismos. Sin embargo están ausentes en mamíferos. En general, los TCSs se componen de una histidina quinasa sensora homodimérica (HK) que se autofosforila, mediante ATP, en un residuo de His y un regulador de la respuesta (RR) al cual se transfiere el grupo fosforilo desde la His hasta un residuo de Asp. El RR fosforilado en el residuo de Asp interacciona posteriormente con el ADN u otras dianas provocando respuestas celulares. La señalización se finaliza con la defosforilación del RR mediada por una actividad fosfatasa intrínseca del RR o inducida por la HK. Existe poco conocimiento estructural de las reacciones de autofosforilación, fosfotransferencia y defosforilación llevadas a cabo por el par HK/RR (Casino, 2008).

La motilidad las cianobacterias y se ha estudiado principalmente en los organismos filamentosos durante muchas décadas (Diehn *et al.*, 1979; Häder, 1987). A pesar de los estudios extensos, muy poco se ha establecido en relación con el mecanismo de regulación de la motilidad en las cianobacterias. La determinación del genoma completo de la cianobacteria *Synechocystis* sp cepa PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) ha revelado una serie de marcos de lectura abiertos (ORFs) homólogos a la proteína quinasa de tipo eucariota y la proteína fosfatasa. Sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por responder, en parte, debido a las limitaciones del estudio estructural de estos sistemas completos. Así, podríamos plantearnos cómo se propaga en líquenes la señal producida por la lectina fúngica a través de la membrana en el fotobionte hasta el interior celular, desde el momento que la lectina se une al receptor de pared presente en los fotobiontes del talo liquénico.

8.1. Implicación del AMPc en el movimiento celular

La **adenosín monofosfato cíclico** (AMPc), sintetizado a partir de ATP por la enzima adenilato ciclasa, es una importante molécula de señalización en la regulación de diversas actividades biológicas desde procariotas a animales superiores (Peterkofsky *et al.*, 1993; Hanoune *et al.*, 1997). En las cianobacterias, las concentraciones celulares de AMPc cambiar rápidamente en respuesta a los cambios ambientales (Ohmori *et al.*, 1988; 2002; Ohmori, 1989), lo que sugiere que el AMPc actúa como un mensajero en la transducción de señal. Hasta el momento, se han aislado varios genes que codifican la adenilato ciclasa, en cianobacterias filamentosas y se han caracterizado sus estructuras moleculares (Katayama *et al.*, 1995; Yashiro *et al.*, 1996; Katayama & Ohmori, 1997). Cada adenilato ciclasa tiene un dominio catalítico bien conservado en las regiones C-terminales mientras que regiones N-terminales diferentes (Katayama & Ohmori, 1997). Este carácter estructural sugiere que cada región específica se encarga de detectar determinados estímulos ambientales (Terauchi & Ohmori, 2004). *Spirulina plantensis*, por ejemplo, contiene el sistema un dos componentes quinasa/fosfatasa, donde el residuo de histidina quinasa se fosforila en respuesta a la señal de un receptor de señal primario (Kasahara & Ohmori, 1999) y finalmente, la fosforilación activa la actividad catalítica para formar AMPc (Terauchi & Ohmori, 2004).

El AMPc aumenta la motilidad tanto de especies del género *Spirulina* como *Synechocystis*, en ambos casos se dice que puede participar directamente en el movimiento celular, sin embargo, la maquinaria que participa en el desplazamiento parece ser diferente entre estas dos cianobacterias.

Se ha informado que SwmA, una glicoproteína asociada a la superficie celular, es necesaria para la motilidad de *Spirulina* (Brahamsha, 1996). La búsqueda en las Bases de datos muestra que existe una proteína similar a SwmA en *Synechocystis* sp. PCC 6803, donde si tal proteína participa directamente en la motilidad celular, el AMPc podría funcionar como mensajero de señales ambientales tales como luz-oscuridad para regular la acción de la proteína a través de una cascada de señales. Experimentos de microarrays realizados con el mutantes de *Synechocystis*, sugieren de nuevo que el AMPc es un participante importante en la transducción de la señal para la motilidad ya que, la inactivación de *cya1* (gen que codifica la proteína adenilato ciclasa) o *sycrp1* (codifica una proteína receptora de AMPc) da como resultado la aparición de cepas no-móviles (Bhaya, 2004).

8.2. GTPasas, reguladores del citoesqueleto

Las **proteínas Rho** son unas pequeñas proteínas G, capaces de regular el citoesqueleto de actina durante la propagación celular, quimiotaxis o procesos invasivos (Hall, 1998). Con un peso molecular aproximado de 20-40kDa (Taleisnik, 2006) constituyen una familia distinta dentro de la superfamilia Ras relacionados con proteínas G pequeñas y se encuentran en todas las células eucariotas. Se conocen hasta 22 genes de mamíferos que codifican proteínas Rho, 5 para *S. cerevisiae*, 10 y 11 para *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* respectivamente (Jaffe & Hall, 2005). La activación de GTPasas como de Rho, Rac, Cdc42 conduce al ensamblaje de los filamentos de actina con miosina (Etienne-Manneville & Hall 2002). Muchos ligandos ejercen su acción mediante la unión a receptores de hasta siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Taleisnik, 2006). Estudios en neutrófilos han sugerido que los miembros de la familia Rho, que regulan la polaridad celular y la dinámica del citoesqueleto, pueden jugar un papel en la detección de la dirección. La proteína Rho activa se acumula en la parte trasera de la migración de estas células y parece dirigir retracción de los urópodos mediante la regulación del conjunto de filamentos de miosina II y sus interacciones con la actina en la corteza celular (Xu *et al.*, 2003).

Las proteínas Rho tienen dos formas interconvertibles: la forma unida a GDP, inactiva, y la forma unida a GTP activa, donde la unión de GTP conlleva un cambio conformacional de la proteína en la región de unión al efector (Figura 22).

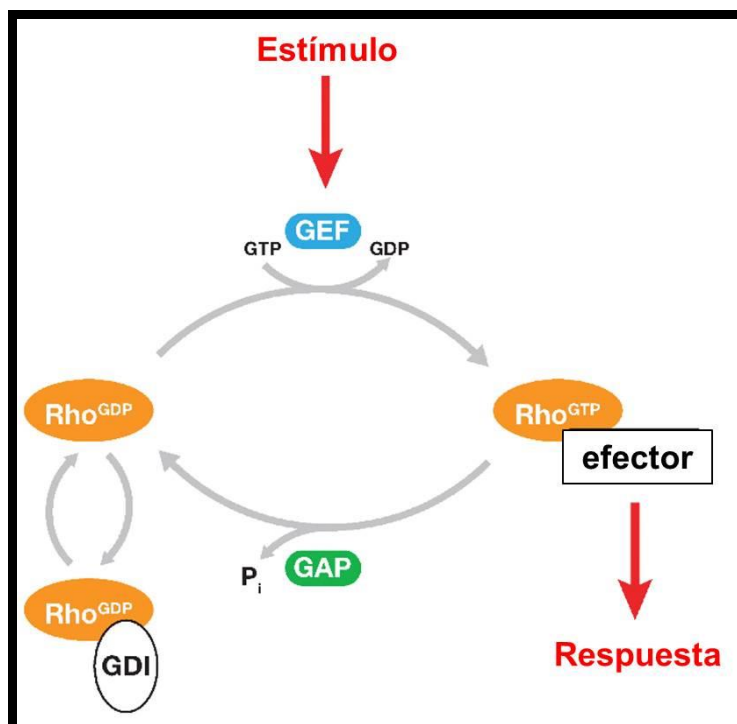


Figura 22. Ciclo de la GTPasas. La forma inactiva aparece unida a GDP mientras que la forma activa se está unida a GTP. En células mamíferas, su actividad está regulada por una gran familia de 85 GEFs (Guanine nucleotide Exchange factors) y más de 80 GAPs (GTPase activating proteins) y 3 GDIs (GDP-dissociation inhibitor). La GTPasa activa interactúa con proteínas efectoras para mediar la respuesta (Adaptado de: Jaffe & Hall, 2002).

En células no estimuladas, la forma unida de GDP de las proteínas Rho está unida a un complejo GDI (GDP-dissociation inhibitor), manteniendo al mayor parte de Rho en el citosol (Taleisnik, 2006). Debido a que las tasas intrínsecas de la hidrólisis de GTP y el intercambio de GDP/GTP son lentas, el ciclo de GDP/GTP es regulado por proteínas activadoras de GTPasa (GAP: GTPase activating proteins) y factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF: Guanine nucleotide Exchange factors), que aumentan las tasas intrínsecas en varios órdenes de magnitud (Bos et al., 2007). Por activación del receptor, Rho se libera de GDI, permitiendo su activación por GEFs, primero actúa sobre Rho liberando GDP, a continuación GEF es reemplazado por GTP para dar lugar a la conformación activa de la proteína Rho. Las proteínas GAPs aumentan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, facilitando la hidrólisis de GTP a GDP. La forma unida a GDP se une entonces a GDI, dando lugar a un complejo inactivo que vuelve al citosol (Taleisnik, 2006).

En las bacterias, las GTPasas tienen funciones importantes en la traducción, la translocación de proteínas, modificación ARNt y el conjunto de ribosomas. Sin embargo, datos recientes han revelado que pequeñas GTPasas-Ras así como grandes GTPasas participan en la regulación de la polaridad celular, transducción de señales y, posiblemente,

también en la división celular (Bulyha *et al.*, 2011). MglA homóloga a las GTPasa-Ras regula la polaridad celular en *M. xanthus* y de manera similar, la GTPasa grande FlhF, junto con la ATPasa FlhG regula la localización y número de flagelos en bacterias flageladas. En cianobacterias, varios genes que codifican GTPasas han sido secuenciados (Geisler *et al.*, 1996; Fulgosi *et al.*, 2002; Arimura *et al.*, 2002), no obstante ninguno de ellos ha sido relacionado con la regulación del citoesqueleto.

En definitiva, la migración celular es un proceso complejo que requiere la regulación coordinada del citoesqueleto y la adhesión celular. Los datos sobre el movimiento en cianobacterias, en concreto de *Nostoc*, son escasos y en el caso de los cianobiontes inexistentes hasta la fecha. La falta de información en este sentido hace especialmente difícil la toma de decisiones a la hora de abordar este tipo de estudios, sin embargo, a partir de los datos recogidos se puede concluir que la movilidad de los fotobiontes liquénicos por lectinas fúngicas puede ser inducida desde la acción citoaglutinante de estas lectinas. La glicoproteína es capaz de reclutar biontes compatibles formando vínculos de afinidad entre ligando y receptor de la lectinas de los diferentes fotobiontes. Esto implica que las moléculas de lectinas deben ser capaces de atraer diferentes algas o cianobacterias en una suspensión celular. El movimiento de los cianobiontes implicaría la participación del citoesqueleto mediante episodios sucesivos de contracción-relajación realizados por el citoesqueleto, que presumiblemente, requiere la colaboración de la actina interactuando con la miosina o proteínas similares. Finalmente, este último paso podría estar acompañado por reclutamiento de fotobiontes en las cercanías del hongo liquenizado, lo que podría desarrollar un tipo de desplazamiento en superficie por parte de los cianobiontes. Tomando como punto de partida esta hipótesis, se enumerarán los objetivos de la presente memoria en el apartado siguiente.

OBJETIVOS

- Estudiar el patrón de reconocimiento-discriminación entre los biontes que conforman el cianolíquen *Peltigera canina* y comparar con el modelo de reconocimiento existente en clorolíquenes.
- Verificar la existencia de un sistema de quimioatracción inducido por las lectinas fúngicas y determinar el tipo desplazamiento de los cianobiontes hacia el hongo liquénico.
- Analizar los mecanismos celulares implicados en el movimiento quimiotáctico del cianobionte y las proteínas necesarias para su locomoción.
- Iniciar un estudio de los sistemas de transducción de señal implicados en el desplazamiento de los cianobiontes

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Cianolíquen

La especie utilizada en este trabajo fue *Peltigera canina* (L.) Willd, perteneciente al Orden *Peltigerales*, recolectada en El Escorial (Madrid, España). Cianolíquen de amplia distribución común en las zonas ártica y boreal de Europa, crece en las proximidades o en el interior de zonas boscosas, sobre rocas, taludes y suelo musgoso, presenta *Nostoc* sp. como fotobionte. Las muestras recolectadas fueron secadas en oscuridad a temperatura ambiente hasta su posterior uso, nunca superior a 2 semanas.



Figura 23. Lugar de recolección y ejemplar del cianolíquen *Peltigera canina* (L.) Willd.

1.2. Clorolíquen

En los experimentos comparativos entre ciano y clorolíquenes se utilizaron talos de *Evernia prunastri* (L.) Ach., un clorolíquen del Orden *Lecanorales* que contiene el alga verde *Trebouxia excentrica* como clorobionte. La recolecta de los ejemplares se realizó sobre la corteza de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., en el encinar de “La Quinta” (El Pardo, Madrid, España). Los ejemplares se dejaron secar al aire y se almacenaron en oscuridad hasta su uso.

2. AISLAMIENTO DEL FOTOBIONTE

2.1. Aislamiento de cianobiontes de *P. canina*

El procesado de las muestras para el aislamiento del cianoliquen se realizó siguiendo el protocolo de Wastlhuber & Loos (1996) con modificaciones. Muestras de 1 g de talo de *P. canina* fueron sumergidas en agua destilada para su rehidratación durante 5 min. Seguidamente se maceraron en un mortero con 15 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP-polivinilpirrolidona-40.000 y 0,25 % BSA-bovina seroalbumina-). El homogeneizado fue centrifugado a pulsos de $700 \times g$ y la pella obtenida se resuspendió en 5 mL de tampón de extracción. Este último paso se repitió un total de 4 veces. El sobrenadante resultante fue centrifugado a $1.200 \times g$ durante 10 min. Finalmente el sobrenadante obtenido fue desechado y el precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón de extracción.

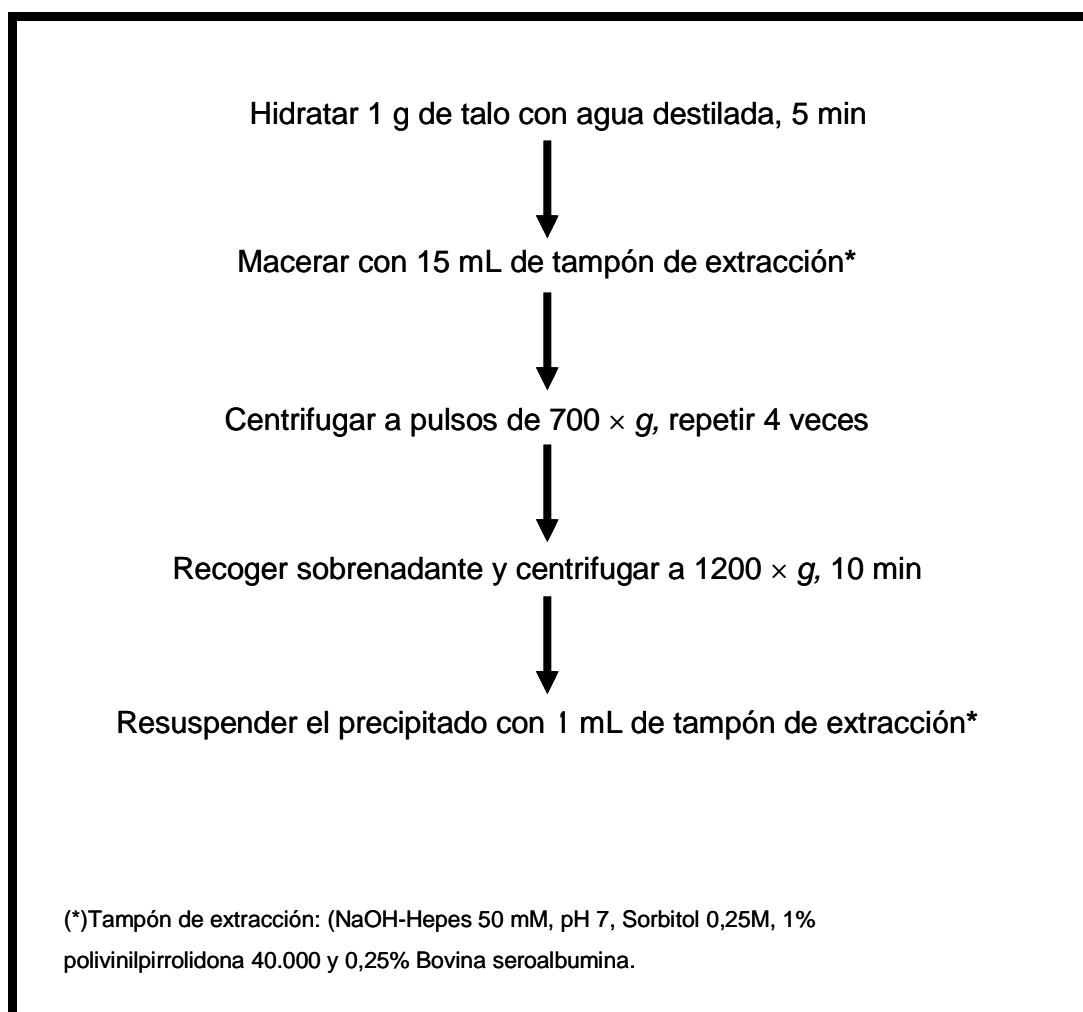


Figura 24. Esquema del aislamiento de cianobiontes a partir de talos de *P. canina*.

2.2. Aislamiento de clorobiontes de *E. prunastri*

Muestras de 0,5 g de talos de *E. prunastri*, previamente lavados con agua destilada para eliminar contaminaciones, se maceraron en morteros de cerámica con 10 mL de agua destilada. El homogeneizado se filtró a través de tres capas de gasa y fue seguidamente centrifugado a $1.400 \times g$ durante 4 min. El sobrenadante fue desechado y el precipitado se resuspendió en 8 mL de una solución de sacarosa 0,25 M. Esta suspensión fue repartida lentamente, con objeto de no romper las fases, en sendos tubos de ensayo conteniendo 5 mL de KI al 80 % (p/v). Se añadieron 2 mL de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2, a cada tubo para después ser centrifugados a $14 \times g$ durante 20 s. La centrifugación generó una densa interfase asentada sobre el KI al 80 % (p/v), conteniendo algas e higas de pequeño tamaño. Esta capa se recuperó con una micropipeta y se volvió a depositar sobre un tubo con 5 mL de KI 80 % (p/v), dejando caer la suspensión por las paredes. De igual modo, se añadieron 3 mL de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,2 y se centrifugó a $36 \times g$ durante 40 s. La interfase algal se recuperó nuevamente con una micropipeta y se depositó sobre un tubo con 5 mL de KI 80 % (p/v). Este último paso se repitió tantas veces como fue necesario hasta lograr una suspensión de algas libre de hifas visible al microscopio óptico (Fontaniella *et al.*, 2000).

3. DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD UREASA EN PAREDES DEL FOTOBIONTE

3.1. Localización citoquímica de la actividad ureasa y observación por Microscopía óptica

La enzima ureasa (EC 3.5.1.5) en medio acuoso, rompe la urea en NH_3 y CO_2 , éste último se convierte en CO_3Co al reaccionar con CoCl_2 . El CO_3Co forma precipitados negros e insolubles de CoS en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, visibles al microscopio óptico indicando la presencia de ureasa en el cianobionte (Gomori, 1952; Millanes *et al.*, 2004).

Cianobiontes previamente aislados, fueron resuspendidos en 5 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 6,9, con urea 40 mM. Seguidamente se incubaron durante 2 h a 30°C . Se añadió CoCl_2 10 mM y se incubó 30 min a 37°C . Tras centrifugar y lavar repetidas veces con tampón fosfato 10 mM, pH 6,9, se añadió una gota de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al

10 % (p/v) en cada muestra durante 30 s y, nuevamente, se volvió a centrifugar y lavar para ser observadas bajo el microscopio óptico (Millanes *et al.*, 2004). Posteriormente y en las mismas condiciones, se resuspendieron en 1 mL de CoCl_2 10 mM y urea 40 mM 30 min a 37°C en agitación constante, otro lote de cianobacterias sin adición de urea a la suspensión, como tratamiento control. Tras centrifugar y lavar, se añadió una gota de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ en cada muestra durante 30 s y nuevamente, se volvió a centrifugar y lavar para ser observadas bajo el microscopio óptico.

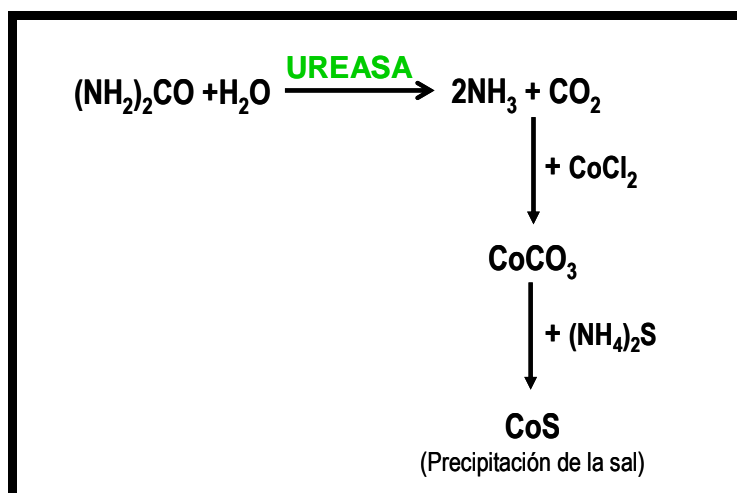


Figura 25. Reacción citoquímica de la ureasa.

Las preparaciones microscópicas de cada una de las muestras fueron observadas en objetivo de inmersión al Microscopio Óptico Olympus BX51 en el modo campo claro utilizando condensadores y objetivos de contraste de fase. Las fotografías fueron tomadas con una cámara CCD, modelo Coolpix 5000 Nikon, acoplada al microscopio mediante un adaptador óptico usando el programa Viewfinder Lite.

4. INDUCCIÓN DE ARGINASA SEGREGABLE

4.1. Obtención de lectina fúngica en *P. canina*

Muestras de 1g de talo de *P. canina* se incubaron en placas petri con 20 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9.2, conteniendo de 40 mM durante 8 h a temperatura ambiente y en oscuridad (Planelles & Legaz, 1987). El medio se filtró a través de papel Whatman 3MM (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK) y posteriormente se dializó

frente a agua destilada, durante 24 h a 4° C en oscuridad. El extracto resultante fue reservado a -20 °C para su posterior utilización en los diferentes ensayos.

4.2. Obtención de lectina fúngica en *E. prunastri*

Para la obtención de arginasa de *E. prunastri* se utilizó el método de Legaz y colaboradores (2001). Se emplearon muestras de 5 g de talo liquénico embebidas en 20 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 conteniendo L-arginina 40 mM durante 8 h a 26 °C en oscuridad. Este medio fue filtrado a través de papel de filtro Whatman 3MM (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK) y posteriormente se dializó frente a 5 L de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, durante 24 h a 4° C en oscuridad. El extracto resultante fue reservado a -20 °C para su posterior utilización en los diferentes ensayos.

4.3. Valoración de proteínas

Para valorar el contenido de proteínas se utilizó el método de Lowry y colaboradores (1951). Se tomaron 1 mL de cada muestra, y se procedió a la valoración de proteínas con el reactivo de Folin midiendo la densidad óptica a 500 nm. Como patrón se empleó BSA (0,1 mg·mL⁻¹).

4.4. Aislamiento de arginasa segregable por cromatografía de afinidad

Lectinas segregables de *P. canina* fueron aisladas por cromatografía de afinidad usando agarosa activada con bromuro de cianógeno (Legaz *et al.*, 2004) conteniendo ureasa previamente obtenida del líquen *E. prunastri*. tal y como se describe en apartado 4.4.1. Inducción de ureasa en *E. prutastri* (Figura 26).

Se prepararon lechos de agarosa hidratando 2 g de agarosa activa con agua milli-Q mezclándola después con una solución 20 mL de arginasa purificada en una concentración de 0,5 mg·mL⁻¹ de proteína en tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 durante 16 h a 4 °C. Posteriormente se añadieron 0,6 g de glicina y se dejó 8 h a temperatura ambiente (Walters, 1985).

La agarosa activada unida a ureasa fue empaquetada en columnas de 3 cm de largo por 1,5 cm de diámetro interno y se lavaron con 300 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 manteniendo un flujo constante de 1 mL·min⁻¹. A continuación, se añadió arginasa en un volumen final de 2 mL. Estos medios se mantuvieron en contacto con la matriz durante 2 h a temperatura ambiente. Una de las columnas se eluyó con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y la otra con el mismo tampón conteniendo α -D-galactosa 50 mM, obteniéndose 7 fracciones de 2 mL cada una. Se valoró la cantidad de proteína eluida mediante el método de Warburg & Christian (1941).

4.4.1. Inducción de ureasa en *E. prunastri*

Muestras de 15 g de talo de *E. prunastri* fueron embebidos en 150 mL de tampón fosfato potásico 75 mM a pH 6,9 durante 6 h en oscuridad (Pérez-Urria & Vicente, 1989) con urea a una concentración de 40 mM. El medio fue filtrado a través de filtros Millipore GS (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de 0,22 μ m de diámetro de poro y dializado frente al mismo tampón durante 24 h a 2° C para eliminar metabolitos de bajo peso molecular. El dializado fue resuspendido en un volumen final de 400 mL y llevado a saturación con sulfato de amonio al 60 % y centrifugado a 43.000 $\times g$ durante 1 h a 2° C. El sobrenadante se dializó nuevamente frente a 5 L de tampón fosfato 1 mM, pH 6,9 durante 24 h y 2° C. La proteína obtenida fue absorbida sobre un gel de fosfato de calcio (75 mg de peso seco de gel por mg de proteína). El precipitado de una centrifugación de dicho gel a 9.000 $\times g$ durante 10 min fue utilizado para eluir la proteína con tampón fosfato a concentraciones crecientes desde 1 a 100 mM, en incrementos de 5 mM. La muestra eluida de la fracción de tampón fosfato 1 mM se filtró a través de una columna de Sephadex G-200 (21 cm \times 3 cm) y equilibrada con el mismo tampón (Legaz *et al.*, 2004).

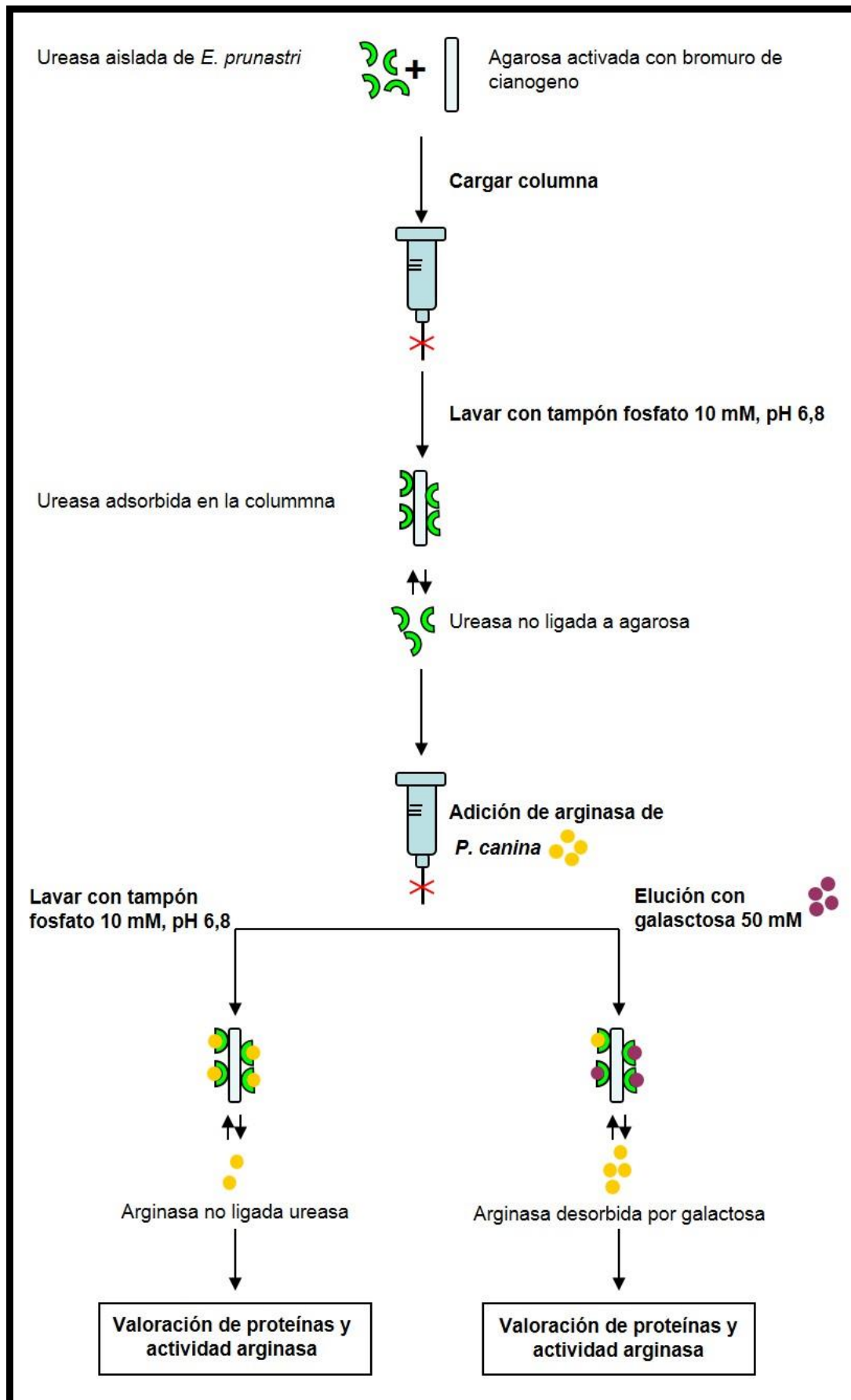


Figura 26. Aislamiento de arginasa por cromatografía de afinidad.

4.5. Actividad arginasa

La actividad arginasa fue determinada mediante el método de microdifusión de Conway (1962) midiendo la producción de amonio en la mezcla de reacción. Dicha mezcla, presente en el pocillo externo, contenía 10 μmoles de tampón Tris-HCl a pH 9,5, 7,5 μmoles de ácido maleico 5 μmoles de Mn^{2+} , 8,1 mg de ureasa, 0,4 μmoles de L-arginina y 1 mL de extracto a valorar (obtenido a partir de las alícuotas recogidas de cada una de las columnas) en un volumen final de 3 mL. La reacción se llevó a cabo a 37° C durante 30 min y se detuvo por adición de 0,5 mL de K_2CO_3 saturado. A continuación se esperó 2 h para que se produjese la difusión del NH_4^+ al pocillo interno, con la consecuente formación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se valoró la actividad específica de la arginasa que fue definida como μmoles de amonio producido por mg de proteína y minuto (Legaz & Vicente, 1982). Se valoró la actividad específica, así como la cantidad de proteína mediante el método de Warburg & Christian (1941).

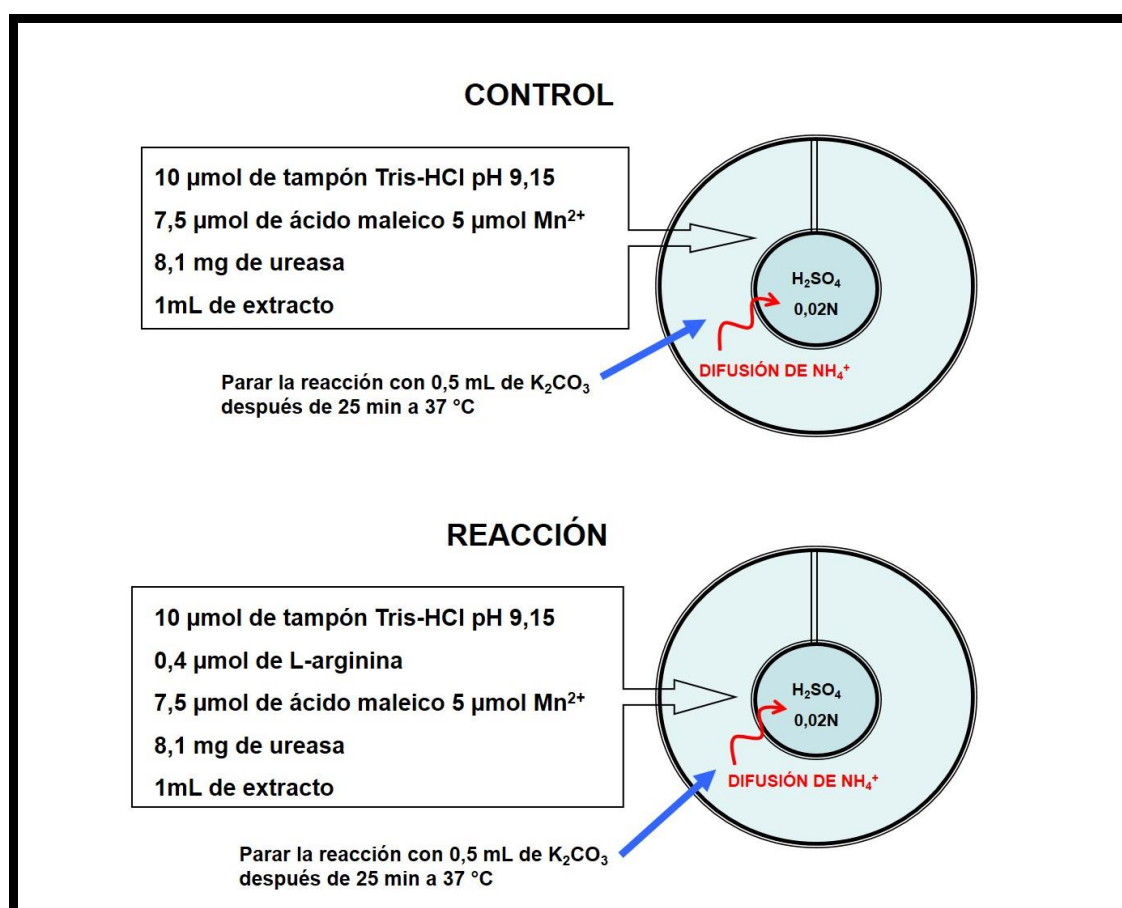


Figura 27. Valoración de la actividad arginasa mediante el método de Conway (1962).

4.6. Análisis comparativo de la lectina fúngica de *P. canina* y *E. prunastri* mediante electroforesis proteica

Arginasas de segregables, tanto de *P. canina* como de *E. prunastri*, fueron analizadas por PAGE-SDS según Laemmli (1970). Ambas arginasas se obtuvieron según los apartados 4.1 Obtención de lectina fúngica en *P. canina* y 4.2. Obtención de lectina fúngica en *E. prunastri* respectivamente. A continuación, fueron aisladas por cromatografía de afinidad usando agarosa activada con bromuro de cianógeno (apartado 4.4. Aislamiento de arginasa segregable por cromatografía de afinidad). La concentración de ambas proteínas se determinó mediante el método de Lowry (apartado 4.3. Valoración de proteínas). Posteriormente se disolvieron en tampón laemmli conteniendo β -mercaptoetanol 50 μ M y se cargaron en el gel.

La separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) se llevó a cabo en un sistema Mini-Protean® 3 de Bio-Rad con geles de 0,75 mm de grosor. Se utilizaron 20 μ g de extracto de ambas proteínas:

- Medio de incubación de *Evernia* y/o *Peltigera* sin pasar por columna.
- Fracción de *Evernia* y/o *Peltigera* eluida con α -D-galactosa 50 mM que mostró mayor actividad arginasa.

Para determinar el peso molecular de las muestras se cargó en el gel la mezcla de proteínas la mezcla de proteínas Precision plus, protein kaleidoscope Standards cat 161-0375, mezcla de proteínas fluorescentes con pesos comprendidos entre 10-250 kD (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250) y como control positivo 10 μ g de BSA. Sometiéndolas a una corriente eléctrica de voltaje constante (150 V) durante 1 h. El tampón de corrida empleado fue Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 1 % (p/v).

4.4.1. Revelado de los geles

El revelado de los geles se realizó mediante tinción con plata (Gottlieb & Chavko, 1987) utilizando el kit de Bio-Rad Silver Stain Plus™. Los pasos realizados se describen a continuación:

- Fijación: los geles se depositaron en cubetas de cristal y se sumergieron durante 20 min en agitación suave en una solución 40 mL de que contenía metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), un concentrado de acelerador de fijación al 10% (v/v) y agua destilada desionizada al 30 % (v/v).
- Lavado: se decantó la disolución y los geles fueron sometidos a 2 lavados de 15 min en agitación en 400 mL de destilada.
- Tinción: La solución de tinción se preparó en el momento, agregando en 35 mL de agua destilada: 5 mL de solución de plata conteniendo NH_4NO_3 - AgNO_3 al 5% (v/v), 5 mL de solución reductora (ácido tungstosilícico al 5% (v/v)) y reactivo de revelado con formaldehído. Inmediatamente después se añadieron 50 mL de una solución aceleradora con Na_2CO_3 al 2,5 % (p/v). Los geles fueron sumergidos en dicha solución hasta que las bandas se hicieron visibles, sin sobrepasar los 15 min. La reacción se paró con una solución de ácido acético al 5 % (v/v).

5. PURIFICACIÓN DE UREASA PRESENTE EN PARED

5.1 Obtención de ureasa

Cianobiontes previamente asilados, se resuspendieron en 5 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 con urea 40 mM. Seguidamente se incubaron a 30° C durante 0, 2, 4 y 6 h. Tras centrifugar y lavar varias veces, se procedió a una rotura mecánica con alúmina en hielo. El homogeneizado fue disgregado mediante ultrasonidos a 20 Kciclos·s⁻¹ durante 2 min en frío. La pella obtenida se resuspendió en 5 mL de agua destilada, se añadió Tween al 0,5 % y se dejó reposar 12 h a 4° C. A continuación se lavo repetidas veces a 3.200 × g durante 10 min a 2° C hasta que no había espuma. La muestra resultante se resuspendió en agua destilada con NaCl al 2 % (p/v) y sometida a una rotura mecánica por ultrasonido a 20 Kciclos·s⁻¹ durante 2 min en hielo.

Posteriormente se centrifugo a 3.200 × g a 2° C y el sobrenadante obtenido se dializo frente a agua destilada a 4 °C durante 12 h (Legaz & Vicente, 1989). La cantidad de proteínas presentes en el extracto resultante se analizó por el método de

Warburg & Christian (1941). La actividad arginasa fue determinada mediante el método Conway (1962) utilizando el reactivo de Nessler mediante la reacción colorimétrica que se produce al reaccionar el amonio presente en la muestra con el reactivo y posteriormente midiendo la densidad óptica a 440 nm en el espectrofotómetro Unicam Helios Beta.

5.2. Aislamiento de ureasa por cromatografía de afinidad

Ligandos de pared celular fueron aislados por cromatografía de afinidad usando agarosa activada con bromuro de cianógeno (Legaz *et al.*, 2004) conteniendo arginasa, obtenida en la incubación de 1 g de *P. canina* con 20 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,2, conteniendo 40 mM de L-arginina, durante 8 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se prepararon lechos de agarosa hidratando 2 gr de agarosa con agua milli-Q mezclándola después con una solución 20 mL de arginasa purificada en una concentración de 0,5 mg·mL⁻¹ de proteína en tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 durante 16 h a 4 °C. Posteriormente se añadieron 0,6 g de glicina y se dejó 8 h a temperatura ambiente (Walters, 1985). La agarosa activada unida a arginasa fue empaquetada en columnas de 3 cm de largo por 1,5 cm de diámetro interno y se lavaron con 300 mL de tampón fosfato 10 mM a pH 6,8 manteniendo un flujo constante de 1 mL·min⁻¹. A continuación, se añadió ureasa en un volumen final de 2 mL. Estos medios se mantuvieron en contacto con la matriz durante 2 h a temperatura ambiente. Una de las columnas se eluyó con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y la otra con el mismo tampón conteniendo α -D-galactosa 50 mM, obteniéndose 6 fracciones de 2 mL cada una. Se valoró la cantidad de proteína eluida mediante el método de Warburg & Christian (1941).

La actividad ureasa fue determinada mediante el método de microdifusión de Conway (1962) midiendo la producción de amonio en la mezcla de reacción. Dicha mezcla contenía 0,5 mL de urea 40 mM, 1,5 mL de tampón fosfato pH 6,8 y 1 mL de extracto a valorar en un volumen final de 3 mL. La reacción se llevó a cabo a 37° C durante 30 min y se detuvo por adición de 0,5 mL de K₂CO₃ saturado. Se valoró la actividad específica de la ureasa, definida como 1,0 μ mol de amonio producido por mg de proteína y minuto.

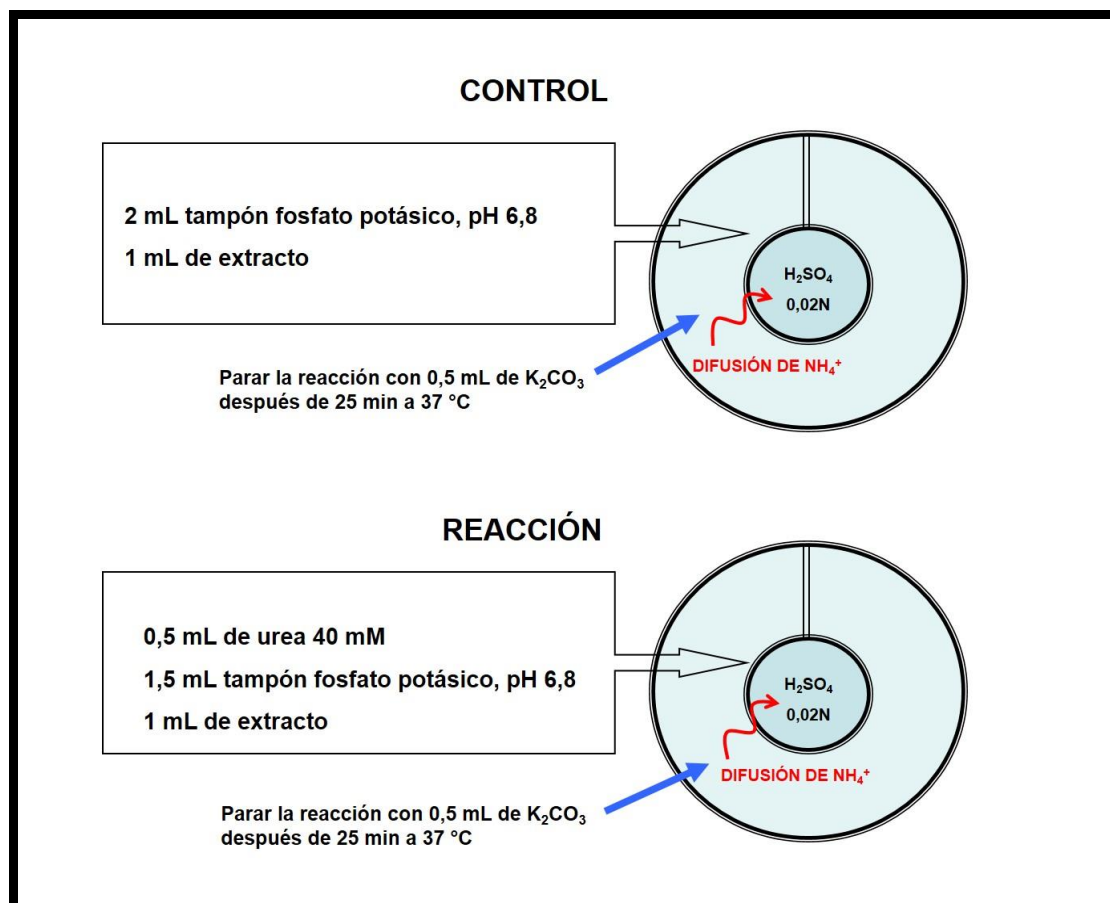


Figura 28. Valoración de la actividad ureasa mediante el método de Conway (1962).

6. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE LOS CIANOBIONTES

6.1. Marcaje de arginasa con fluoresceína (ITCF)

La proteína arginasa, previamente inducida con L-arginina, segregada y parcialmente purificada fue marcada con isotiocianato de Fluoresceína (ITCF) (Sigma Chem. Co.) (Molina *et al.*, 1993).

El marcaje con el fluoróforo se preparó a razón de 10 μg de ITCF por μg de proteína durante 1 h a 30° C en oscuridad y agitación constante. La mezcla se dializó frente a agua destilada. La proteína fluorescente fue utilizada en experimentos de ligamiento a cianobiontes.

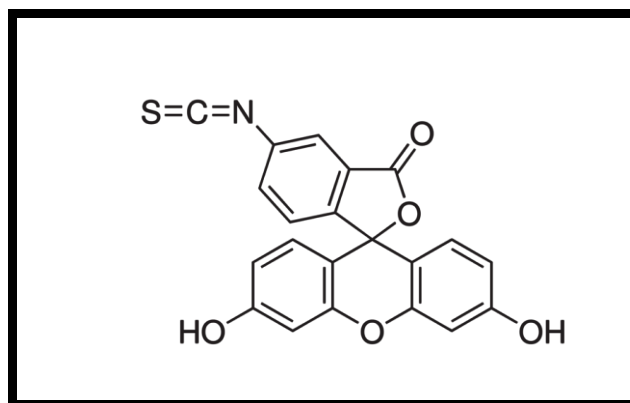


Figura 29. Molécula de isotiocianato de fluoresceína (ITCF).

6.2. Unión de lectina segregable marcada con ITCF a cianobiontes

Cianobiontes previamente aislados, fueron centrifugados a $900 \times g$ durante 5 min. El precipitado resultante fue incubado con una suspensión de 2 mL de lectina segregable marcada con ITCF durante 2 h a 30°C en agitación constante. A continuación, se centrifugó durante 5 min a $10.000 \times g$ y se resuspendió en 1 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) para poder ser procesado y analizado mediante microscopía de fluorescencia tal y como se describe en el apartado 6.4. Microscopía de fluorescencia.

6.3. Desorción de lectina marcada unida a la pared celular

Un lote de células unidas a lectina segregable marcada con ITCF se reservó para estudios de desorción. Células incubadas con lectina segregable marcada durante 2 h a 30°C en agitación constante, fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 5 min. El precipitado resultante, se lavó varias veces con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% PVP 40.000 y 0,25 % BSA) para eliminar la proteína marcada no unida a pared. Un lote de células fueron incubados con 1 mL de una disolución de α -D-galactosa 50 mM en tampón de extracción durante 1 h a 30°C en oscuridad (Legaz *et al.*, 2004) para desorber la lectina marcada unida a pared. Mientras otro lote fue incubado con manosa 50 mM en las mismas condiciones. La modificación de los niveles de fluorescencia en el sobrenadante antes y después del tratamiento con los respectivos monosacáridos fue analizada utilizando el espectrofluorímetro Kontron SF25 (Kontron Instruments A6, Zurich, Switzerland). Primero se realizó un espectro de excitación y emisión del fluorocromo utilizado,

isotiocianato de fluoresceína. Las células obtenidas se examinaron mediante microscopía de fluorescencia según el protocolo que se describe a continuación.

6.4. Microscopía de Fluorescencia

El procesado de las muestras para microscopía de fluorescencia se hizo siguiendo el método de Heath (1987) con modificaciones. Para ello, se colocaron 30 µL de una disolución de polilisina 1,0 µM sobre un cubreobjetos durante 8 h en un ambiente húmedo para evitar una excesiva desecación. Transcurrido este tiempo se retiró la polilisina no fijada con un capilar y se colocaron sobre el cubre 100 µL de suspensión de cianobacterias *Nostoc* sp., utilizadas para los diferentes experimentos detallados en los apartados: 6.2. Unión de lectina segregable marcada con ITCF a cianobiontes, 6.3. Desorción de lectina marcada unida a la pared celular y 12.1. Estudio del efecto de los inhibidores del citoesqueleto sobre la tinción con faloidina-ITCF. Después de 2 h se retiró el resto del medio y las cianoalgas no fijadas. El montaje de las preparaciones se llevo a cabo en un portaobjetos con una gota de Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) que llevaba incorporado Dafco para evitar el decaimiento de la fluorescencia. A continuación se colocó el cubreobjetos con las muestras. Se guardaron las preparaciones en oscuridad a 4 °C durante 12 h. Las muestras marcadas se observaron con un microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara refrigerada Olympus DP72, con una lámpara de mercurio U-RFL-T y un sistema de fluorescencia reflejada acoplados. El filtro de fluorescencia utilizado fue el requerido para el ITCF, con una longitud de onda de excitación azul de la banda estrecha (NB) y una longitud de onda de 465 nm.

7. ENSAYOS DE LIGAMIENTO CRUZADO ENTRE FOTOBIONTES DE *PELTIGERA* Y *EVERNIA* SOBRE LECTINA FÚNGICA

7.1. Incubación con arginasa-ITCF y desorción de lectina marcada unida a la pared celular

Se aislaron tres lotes de fotobiontes a partir de talos *P. canina* y *E. prunastri* siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el apartado 2. Aislamiento del fotobionte. Arginasa segregada y purificada de ambos líquenes, obtenida tal y como

aparece en el apartado 4.4. Inducción de arginasa segregable, fue objeto de los siguientes tratamientos (figura 30).

Fotobiontes previamente aislados, fueron centrifugados a $900 \times g$ durante 5 min. El precipitado resultante fue incubado con una suspensión de 2 mL de lectina segregable ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) marcada con ITCF durante 2 h a 30°C en agitación constante, del siguiente modo:

- Fotobiontes de *P. canina* incubados con arginasa de *E. prunastri*.
- Fotobiontes de *E. prunastri* incubados con arginasa de *P. canina*.

Un lote de cada tratamiento fue reservado para ser incubado con 1 mL de una disolución de α -D-galactosa 100 mM en tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% PVP 40.000 y 0,25% BSA) durante 2 h a 30°C en oscuridad (Legaz *et al.*, 2004). A continuación, todos los lotes se centrifugaron durante 10 min a $5.000 \times g$ y se resuspendieron en 1 mL de tampón de para poder ser procesado y analizado mediante microscopía de fluorescencia tal y como se describe en el apartado 6.4. Microscopía de fluorescencia.

7.2. Determinación de afinidad

Fotobiontes previamente aislados de las especies *P. canina* y *E. prunastri*, fueron incubados de forma independiente con una suspensión de 1 mL de lectina segregable ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) marcada con ITCF durante 2 h a 30°C en agitación constante y oscuridad, como se describe a continuación:

- Fotobiontes de *P. canina* incubados con arginasa de *E. prunastri*.
- Fotobiontes de *E. prunastri* incubados con arginasa de *P. canina*.

Después, se procedió al lavado de las muestras hasta un total de 10 veces para eliminar el exceso de arginasa no unida, mediante centrifugaciones seriadas de 10 min a $5.000 \times g$. Las células *Trebouxia* se lavaron con fosfato potásico 10 mM, pH 7,2 y los cianobiontes *Nostoc* con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% PVP 40.000 y 0,25% BSA).

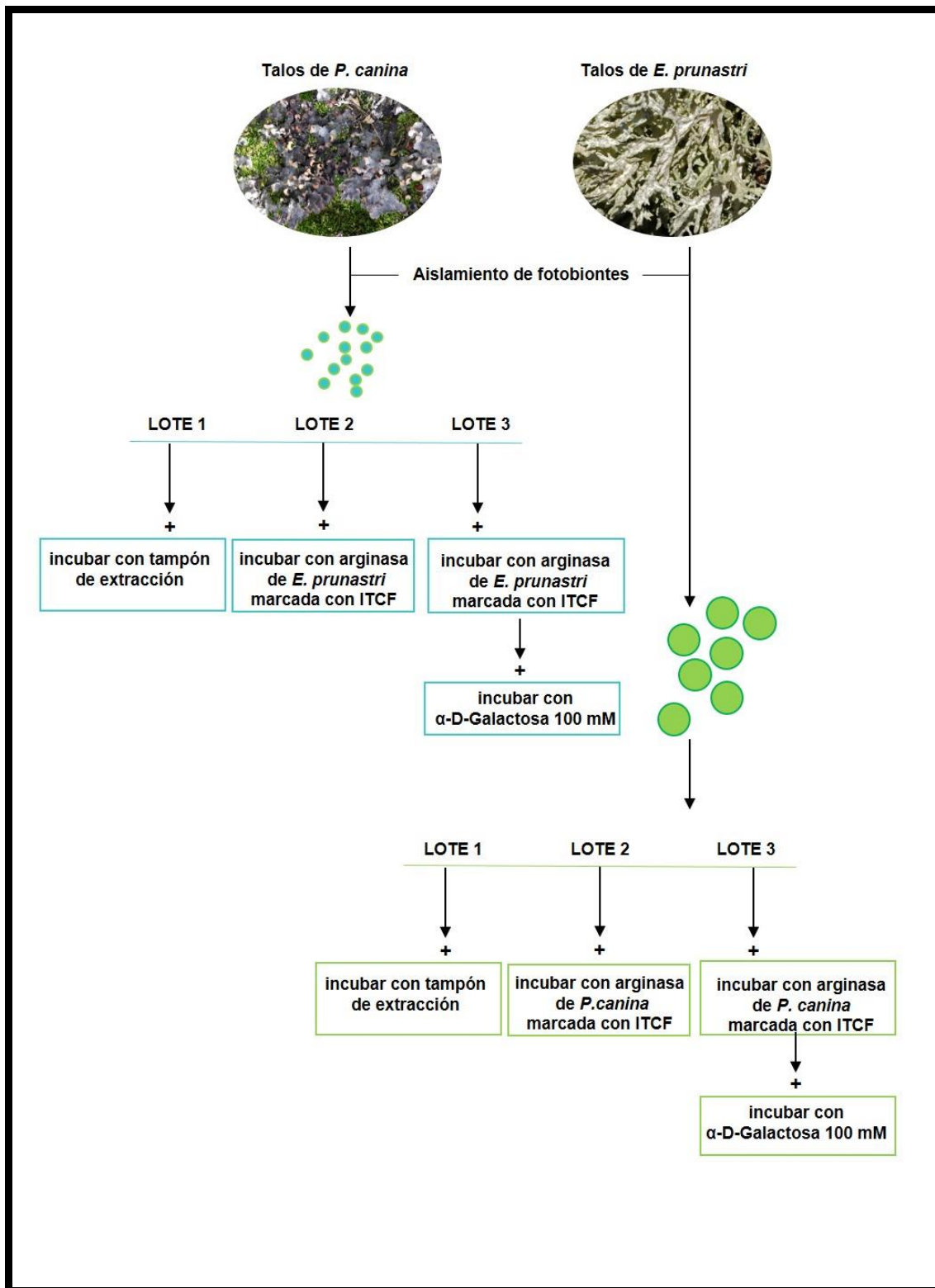


Figura 30. Ensayos de ligamiento cruzado de lectina fúngica sobre fotobiontes, todos los tratamientos fueron analizados mediante microscopia de fluorescencia.

Así mismo se realizó un experimento en paralelo con arginasa no marcada y se midió la cantidad de proteína presente en el sobrenadante del primer lavado en ambos casos mediante el método de Lowry (1951) y se determinó en función del peso en g de

los fotobiontes. Se analizó la fluorescencia relativa emitida del sobrenadante del último lavado mediante el espectrofluorímetro Kontron SFM 25 (Kontron Instruments A6, Zurich, Switzerland).

Ambos lotes fueron resuspendidos en una suspensión de 0,5 mL de lectina segregable, durante 2 h a 30° C en agitación constante y oscuridad del siguiente modo:

- Fotobiontes de *P. canina* unidos a arginasa marcada de *E. prunastri* incubados con arginasa no marcada de *Peltigera*.
- Fotobiontes de *E. prunastri* unidos a arginasa marcada de *P. canina* incubados con arginasa no marcada de *Evernia*.

Las células fueron centrifugadas tras la incubación a $5.000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante resultante fue analizado mediante el espectrofluorímetro y se calculó el coeficiente entre la fluorescencia relativa de la segunda y primera incubación.

7.3. Unión de lectina-ITCF a fotobiontes incubados con α -galactosidasa

Los fotobiontes de *P. canina* y *E. prunastri* aisladas a partir de 0,5 g de talo líquénico fueron expuestas durante 2 h a la hidrólisis de α -galactosidasa (5 unidades de enzima por mL). Después se centrifugaron a $5.000 \times g$ durante 10 min hasta un total de 3 veces. El precipitado de ambos lotes fue resuspendido y las células obtenidas fueron incubadas con una suspensión de lectina marcada donde cada fotobionte se puso en contacto con la lectina de su propio líquen durante 2 h a 30 °C en oscuridad. Igualmente se realizó un control de ligamiento con cianobacterias y/o algas recién aisladas no sometidas a ningún tratamiento. De nuevo, se procedió al lavado de las muestras, en este caso para eliminar el exceso de arginasa no unida, mediante centrifugaciones seriadas de 10 min a $5.000 \times g$ para poder ser procesados mediante microscopía de fluorescencia tal y como se describe en el apartado 6.4. Microscopía de fluorescencia. Se contabilizaron hasta un total de 100 células por tratamiento y se analizaron cuáles estaban marcadas (presentaban fluorescencia verde debido a la unión de la arginasa-ITCF y su receptor de pared) y cuáles no.

7.4. Determinación de la concentración de galactosa

El contenido de galactosa en las muestras fue determinado por la reacción catalizada por una galactosa oxidasa (E.C.1.1.3.9) (Aisaka *et al.*, 1984), la cual oxida el alcohol en C6 de la hexosa con O₂ para dar β-D-galacto-hexo-dilaldosa y peróxido de hidrógeno (Whittaker, 2005). La cantidad de H₂O₂ fue determinada mediante el acoplamiento de una enzima peroxidasa de rábano (EC 1.11.1.7) con guayacol como sustrato, dando lugar a tetraguayacol, el cual desarrolla un color pardo con absorbancia detectable a 470 nm (Caffaro *et al.*, 1996).

Las mezclas de reacción contenían 50 µL de muestra, 0,95 mL de tampón fosfato potásico, 0,1 M, pH 6, 0,5 mL de peroxidasa (Sigma Chem. Co.) (1mg·mL⁻¹) y 50 µL de guayacol. La absorbancia de la mezcla a 470 nm se ajustó a 0. Después, se añadió 0,5 mL de galactosa oxidasa (Sigma Chem. Co.) y se midió el incremento de absorbancia pasados 3 min en un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL. Los valores de D.O. se interpolaron en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de galactosa.

8. ESTUDIO DE INCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* EN PRESENCIA DE PUTRESCINA

Discos de talo de 7 mm de diámetro, previamente hidratados, fueron incubados en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2, en presencia de putrescina 2 y 10 mM durante 2, 4, 6, y 8 h. Todos los experimentos se realizaron a luz ambiente con una cantidad de flujo fotónico constante de 68 µmoles·m⁻²·s⁻¹, medida con un fotoradiómetro QUANTUM LI-185B. Previamente a los tratamientos, se analizó la disposición de los fotobiontes en el talo liquénico mediante microscopía.

8.1. Actividad del fotosistema II (PSII)

Un lote de 8 discos de 7 mm de diámetro fue utilizado para medir la fluorescencia emitida por la clorofila a del PSII de los cianobiontes mediante el equipo portátil *Pocket Plant Efficiency Analyser* (PEA) (Hansatech Ltd., UK). Las muestras fueron adaptadas a oscuridad por 15 min y posteriormente expuestas a un haz de luz de 650 nm con una intensidad de 3000 µmoles·m⁻²·s⁻¹ durante 1 s. El equipo proporcionó la media de la emisión máxima de fluorescencia (F_m), fluorescencia basal (F₀) y F_v/F_m (calculado como F_m-F₀/F_m). F_v/F_m, es proporcional a la máxima

eficiencia fotoquímica del PSII (Björkman & Demmig, 1987) y el parámetro más utilizado en emisión de fluorescencia. Se denomina como el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria cuando todos los centro de reacción del PSII están oxidados (Krause & Weis, 1991).

8.2. Análisis de la clorofila a

Otro lote de 8 discos, dividido a su vez en fracciones de aproximadamente 15 mg (el peso de 2 discos), fue utilizado para medir la cantidad total de clorofilas presentes por gramo de peso fresco de muestra (Bačkor et al., 2009). Después de la incubación, las muestras fueron lavadas durante un min. Los fenoles fueron extraídos con 1 mL de acetona fría durante 1 h y posteriormente se evaporo, el proceso fue repetido hasta un total de 3 veces y finalmente la acetona fue evaporada durante 12 h. A partir de dichas muertas libres de fenoles, se produjo la extracción de las clorofilas con 3 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) durante 1 h a 65 °C y en oscuridad. Los extractos obtenidos fueron enfriados a temperatura ambiente y midió la absorbancia a 665, 649, 435 y 415 nm mediante el espectrofotómetro Helios β (Spectronic Unicam, Cambrige Uk) y se analizó cantidad de clorofila a partir del coeficiente de absorción (Wellburn, 1994):

$$C_a = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$$

Con el fin de evitar reflexión por turbidez, se midió la absorbancia a 750 nm, en caso de superar un valor de 0,01 de unidades de absorbancia, la muestra fue centrifugada a 2000 g durante 1 min.

La relación entre la densidad óptica a 435 y 415, determinó el coeficiente de feofitización, interpretada como el ratio entre clorofila a y feofitinas o la integridad de la clorofila del fotobionte (Ronen & Galun, 1984).

8.3. Determinación de la peroxidación lipídica

Muestras de 0,1 g de talo de *P. canina*, previamente hidratadas, fueron incubadas en una solución de putrescina 2 y 10 mM en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2 durante 2, 4, 6 y 8 h. Seguidamente se estimó el grado de peroxidación

lipídica mediante la valoración por colorimetría del malondialdehído, siguiendo el método de Martin Bačkor y colacoladores (2009) con modificaciones. Cada una de las muestras fueron maceradas y homogeneizadas en 6 mL de TCA al 10 % (p/v) y posteriormente centrifugadas a $20.000 \times g$ durante 20 min.

Sobre 1 mL del sobrenadante obtenido se añadió 1 mL de ácido tiobarbitúico al 0,6 % en TCA al 10% (p/v) y 0,1 mL de butilhidrohitolueno (BHT) al 4 % (p/v) en etanol. Todo ello fue incubado a 100 °C durante 20 min y trascurrido el tiempo se enfrió rápidamente en hielo. Una vez fríos, todos los extractos se centrifugaron nuevamente a $20.000 \times g$ durante 20 min. Para calcular la concentración de malondialdehído se utilizó el coeficiente de extinción molar del MDA a 535 nm, $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$:

$$\text{nmol MDA / gpf} = [(A535-A600) \times \text{mmol} / 1,56 \times 10^5 \text{ mL}] \times [10^6 \text{ nmol} / 1 \text{ nmol}] \times [\text{mL TCA} / \text{gpf}]$$

8.4. Determinación de la actividad glucanasa

Muestras de 0,2 g de liquen fueron incubadas en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2, en presencia de putrescina 2 y 10 mM durante 2, 4, 6, y 8 h. A continuación se aislaron los fotobiontes tal y como aparece en el apartado 2.1. Aislamiento de cianobiontes de *P. canina*. Para analizar los posibles cambios en la actividad enzimática de la enzima β -1,4-glucanasa se procedió a la extracción del contenido proteico de las cianobacterias.

La muestra fue centrifugada durante 10 min a $5.000 \times g$ y posteriormente fue resuspendida en 2 mL acetato de sodio, 50 mM, pH 5. El homogeneizado fue disgregado mediante ultrasonidos a $40 \text{ Kciclos} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 2 min en frío y centrifugado a $10.000 \times g$ a 2° C. El sobrenadante obtenido se tomó para valorar la actividad β -1,4-glucanasa según el método de Summer (1921). Como sustrato de la enzima se utilizó carboximetil celulosa comercial al 0,75 % (p/v) en tampón acetato de sodio, 50 mM, pH 5. La mezcla de reacción constaba de 1,5 mL de tampón acetato de sodio, 50 mM, pH 5 y 1 mL de sustrato y 0,5 mL de muestra. Todas las mezclas de reacción se mantuvieron 3,5 h en un baño de agitación (140 ciclos por min) a 37 °C. En los blancos se omitió el sustrato. Transcurrido el tiempo se añadieron 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 1mL de la mezcla de reacción anterior. Esta mezcla se mantuvo a 100 °C durante 5 min. Cuando se enfrió, se añadieron 8,5 mL de agua

destilada y se midió la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Zeiss modelo PM2 DL.

9. ENSAYOS DE QUIMIOATRACCIÓN DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE CIANOBIONTES

9.1. Verificación de la existencia de desplazamiento quimiotáctico del cianobionte hacia la lectina fúngica

La quimiotaxis de las cianobacterias fue estudiada mediante el método descrito por Sjoblab y colaboradores (1978) con modificaciones. Se añadieron 4,0 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% PVP 40.000 y 0,25 % BSA) en varias placas petri, así mismo se utilizaron capilares en los que se introdujo 20 μL de lectina con una concentración de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como control se utilizaron capilares con tampón de extracción. Mientras que uno de los extremos fue sellado con Blutac®, el extremo abierto se depositó en la placa petri con una inclinación de 45° . Se añadieron 100 μL de una suspensión de cianobacterias a 4 mm del capilar. A continuación las placas fueron cubiertas para evitar la luz, las corrientes de aire así como minimizar la evaporación. La totalidad de las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 h. Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados por la superficie exterior. El contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51. La respuesta quimiotáctica se analizó determinando el tiempo de máxima la entrada de células en el capilar. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

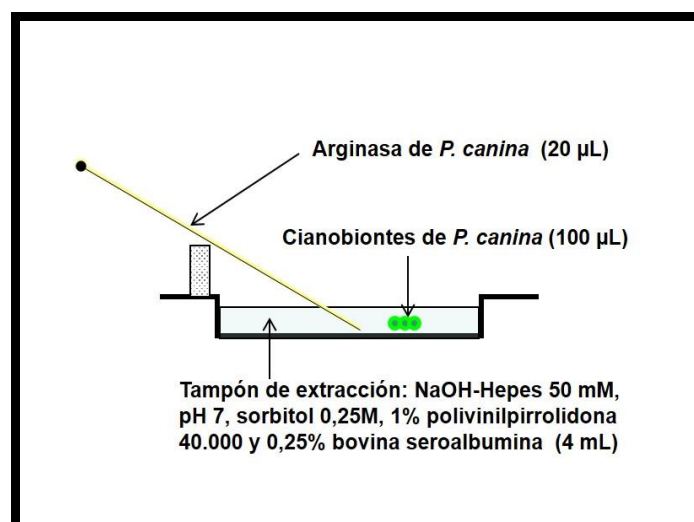


Figura 31. Experimento de quimiotaxis de los cianobiontes de *P. canina* hacia capilar conteniendo lectina fúngica.

9.2. Efecto de la luz sobre el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica

Se analizó el efecto de la luz sobre el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica. El experimento se llevó a cabo en placas petri donde se añadieron 4,0 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) y se dispuso 100 µL de una suspensión de cianobacterias frente a un capilar con 20 µL de lectina con una concentración de 1 mg·mL⁻¹. Todas las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2, 4, 6 y 8 h en una cámara de crecimiento en condiciones de iluminación variable según tratamiento (luz blanca, roja y oscuridad). A continuación se contabilizó el número de células en el interior del capilar utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

9.3. Valoración del efecto dosis-respuesta del desplazamiento quimiotáctico del cianobionte frente diferentes concentraciones de lectina fúngica

Utilizando el tiempo de máxima entrada en el capilar, se cuantificó la relación dosis-respuesta de glicoproteína previamente purificada en el interior capilar a concentración creciente (0, 0,25, 0,50, 0,75, 1 mg·mL⁻¹) durante 8 h. Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados por la superficie exterior. El

contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51, así como las cianobacterias que no habían entrado en el capilar y por tanto presentes en la placa, con el fin de encontrar diferencias entre ambos grupos de células. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

10. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS CIANOBIOTES

10.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la presencia de fimbrias en la superficie de *Nostoc* para poder desplazarse así como posibles orgánulos envueltos en el desplazamiento celular, se analizaron mediante microscopía de barrido (SEM) (Lindroth *et al.*, 1988). Se consideraron tanto las cianobacterias que se habían desplazado hasta el interior del capilar como las presentes en la placa, es decir, las que no se habían movido hacia la lectina fúngica. Las células fueron centrifugadas varias veces a $900 \times g$ durante 5 min y sometidas a varios lavados a temperatura ambiente con tampón fosfato 0,1 M. El precipitado resultante se resuspendió en 500 μ L de glutaraldehído al 3% (v/v) en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2. A continuación se llevó a cabo un proceso de deshidratación de la muestra con soluciones de acetona de concentración creciente (30, 50, 70, 80, 90, 100%) esperando 15 min entre cada deshidratación. Después se realizó el punto crítico, se recubrieron con una capa de oro/paladio y se escanearon a 20KV empleando un microscopio de barrido Jeol JSM-6400. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el programa INCA (Oxford) incorporado al equipo.

10.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el fin de poder analizar en detalle la pared de los cianobiontes así como los componentes que la conforman tanto en el interior como exterior celular, las cianobacterias presentes en el líquen *P. canina*, previamente aisladas, fueron analizadas ultraestructuralmente mediante microscopía electrónica de transmisión (De los ríos & Ascaso, 2002). La suspensión de cianobacterias fue centrifugada durante 10 min a $2.000 \times g$ y se resuspendió en glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato

Milloning, pH 7,4 (Milloning, 1961) a 4 °C durante 6 h. Las muestras fueron lavadas 4 veces 15 min a temperatura ambiente con tampón Milloning. A continuación se dejaron en tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro al 3% en tampón Milloning durante 2 h en oscuridad. Se volvieron a lavar y se procedió a la fase de deshidratación. Las cianobacterias aisladas fueron embebidas en una serie de soluciones de acetona de concentración creciente: 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100 % dos cambios de solución nueva en 30 min. Después de la deshidratación se pasó a la fase de infiltración añadiendo una solución de acetona:resina epon-812 (3:1 v/v) y dejando toda la noche a temperatura ambiente. La muestra se depositó en una solución de resina creciente, acetona:resina epon-812 (1:1 v/v) durante 12 h, se cambió por otra de proporción 3:1 (v/v) durante 12 h. Por último se dejó en resina pura durante 48 h en oscuridad a 70 °C. Los bloques de resina formados se prepararon para ser seccionados en un ultramicrotomo. Después se cortaron en secciones semi-finas hasta obtener la cara del bloque totalmente lisa.

Se realizaron cortes semi-finos (0,5 µm) con una cuchilla de vidrio acoplada a un ultramicrotomo situando dichos cortes en una pequeña balsa de agua. Se tiñeron con azul de metileno para indicar la orientación de los cortes. Los cortes ultrafinos (70-90 nm) se hicieron con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo OmUR Reichert Jung y se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de pioloformo. Se tiñeron con acetato de uracilo al 2 % en agua (v/v) y citrato de plomo (Reynols, 1963) en una placa petri para impedir la exposición al aire. Los cortes se cambiaron rápidamente a otra placa con una lámina de Parafilm® M y unas gotas de solución de citrato de plomo. Las rendijas se retiraron del tinte después de 10 min de contacto y se lavaron tres veces con agua. Las preparaciones se examinaron con el microscopio electrónico de transmisión Goz 10-10.

11. VALORACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO SOBRE EL MOVIMIENTO DEL CIANOBIOTE

11.1. Evaluación del efecto de S-(3,4-diclorobencil) isotiourea o A-22, inhibidor del citoesqueleto bacteriano

Para determinar la posible implicación del citoesqueleto bacteriano en el desplazamiento de cianobiontes de *P. canina* hacia la lectina fúngica, se utilizó A-22 ((S-(3,4-diclorobencil) isotiourea) (sc-204100, Santa Cruz): antibiótico inhibidor de Mre-

B [proteína procariota semejante a actina de eucariontes (Dye *et al.*, 2005; Gitai *et al.*, 2005; Bean *et al.*, 2009))] durante un tiempo de incubación entre 2 y 8 h. Se utilizaron capilares en los que se introdujo 20 μL de lectina con una concentración de 0,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se depositaron 100 μL de una suspensión celular de cianobiontes en placas petri con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) en presencia y ausencia de A-22 a una concentración de 20 μM .

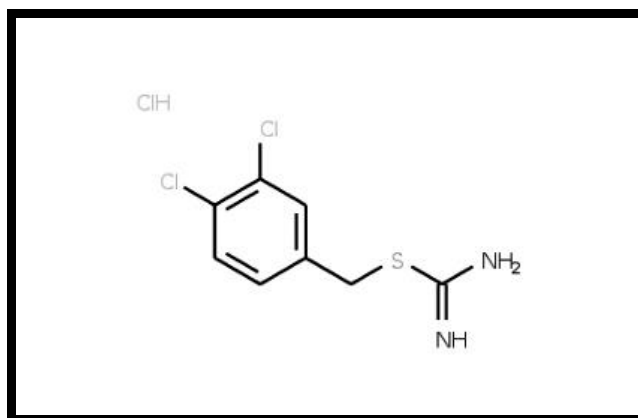


Figura 32. Molécula de A-22 (S-(3,4-diclorobencil) isothiurea) (Santa Cruz Biotechnology).

Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados por la superficie exterior. El contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

11.2. Evaluación del efecto de inhibidores de actina y miosina

La proteína actina u organizadores de actina tales como α -actinina, han sido descritos en cianobacterias (Usmanova *et al.*, 1998). Para estudiar la posible implicación de estas proteínas en el desplazamiento hacia la lectina, se utilizaron inhibidores de la actividad del citosqueleto a distintas concentraciones tales como:

- Blebistatina (B-0560, Sigma): pequeña molécula con una alta afinidad y selectividad hacia miosina II, permeable a las membranas celulares. Un

potente inhibidor de la actividad ATPasa de la miosina II aunque con poco o ningún efecto sobre miosinas de las clases I, V y X (Limouze *et al.*, 2004).

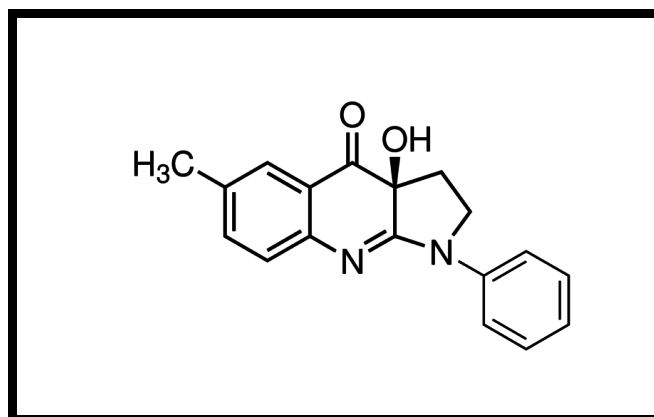


Figura 33. Molécula de blebistatina (Sigma-Aldrich).

- Faloidina (P-5282, Sigma): micotoxina bicíclico heptapéptida perteneciente al grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides* (Vaill.: Fries) Quélet. Este veneno citotóxico es capaz de unirse a los filamentos de actina-F con alta afinidad, impidiendo su despolimerización. (Cooper, 1987; Barden *et al.*; 1987; Faulstich *et al.* 1993; Steinmetz *et al.*, 1998).

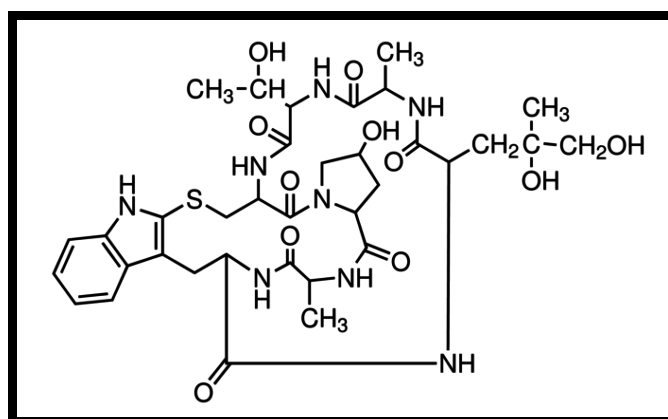


Figura 34. Molécula de faloidina procedente de la especie *Amanita phalloides* (Sigma Aldrich).

- Latrunculina-A (L-5163, Sigma): procedente de poríferos de la especie *Latrunculia magnifica* (Mebis). Tiene la capacidad de secuestrar monómeros de actina en células vivas (Coué *et al.*, 1987). Afecta a la polimerización de la actina formando consistentes complejos en una relación 1:1 entre latrunculina-A y actina-G (Spector *et al.*, 1989).

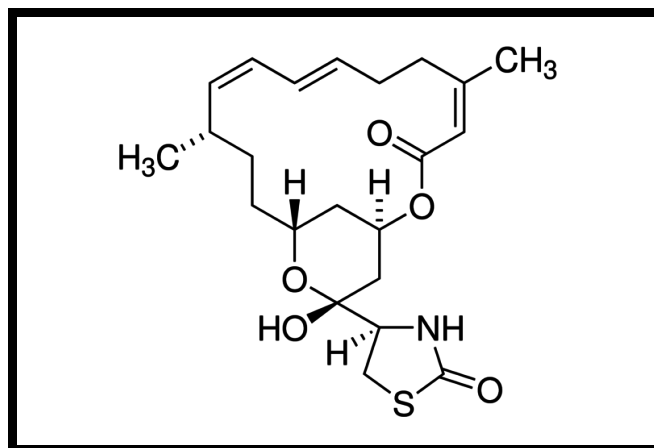


Figura 35. Molécula de latrunculina-A procedente de la especie *Negombata magnifica* (Sigma-Aldrich).

Se analizó el efecto de la blebistatina a distintas concentraciones (10 μ M, 25 μ M) sobre la entrada de cianobacterias en el capilar durante 4 h. Así mismo se hizo con faloidina (0,1 μ M, 0,2 μ M) y latrunculina-A (10 μ M).

Se realizaron estudios del movimiento utilizando los mismos inhibidores pero de forma conjunta en el mismo experimento. El efecto conjunto de blebistatina (25 μ M) y faloidina (0,2 μ M), blebistatina (25 μ M) y latrunculina-A (10 μ M) fue analizado a máxima concentración en todos los casos. Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados por la superficie exterior. El contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

12. ESTUDIO DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO SOBRE LA POLARIDAD DEL CIANOBIONTE

12.1. Estudio del efecto de los inhibidores del citoesqueleto sobre la tinción con faloidina- ITCF

Cianobiontes de *P. canina* fueron atraídos hacia un capilar conteniendo 20 mg de lectina purificada a partir del mismo liquen. Las células fueron incubadas con blebistatina 25 μ M y blebistatina 25 μ M y faloidina 0,2 μ M combinadas durante 4 h.

Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados superficialmente. El contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y teñidos con faloidina-ITCF como se describe en el apartado 6.4. Microscopía de Fluorescencia. El número de células totales así como aquellas con tinción asimétrica se determinó utilizando el programa Image Tool 2.0. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

12.2. Cuantificación de la fluorescencia

Cianobiontes de *P. canina* fueron atraídos hacia un capilar conteniendo 20 mg de lectina purificada a partir del mismo liquen. Las células fueron incubadas con blebistatina 25 μ M, blebistatina 25 μ M y faloidina 0,2 μ M combinadas, latrunculina-A 10 μ M y A-22 20 μ M durante 4 h. Después de la incubación se recogió el contenido de los capilares, fue depositado en un porta y teñidos con faloidina (P-5282, Sigma). A continuación se cuantificó la fluorescencia mediante microscopía confocal.

El procesado de las muestras para microscopía confocal se hizo siguiendo el método de Heath (1987) con modificaciones. Para ello, se colocaron 30 μ L de una disolución de polilisina 1,0 μ M sobre un cubreobjetos durante 8 h en una cámara de humedad, evitando la desecación en todo el proceso. Transcurrido este tiempo se retiró la polilisina no fijada con un capilar y se colocaron sobre el cubre 100 μ L de suspensión de cianobacterias *Nostoc* sp, 3 cubres por tratamiento. Después de 2 h se retiró el resto del medio y las cianobacterias no fijadas.

Para preservar las estructuras celulares se utilizaron 30 μ L de glutaraldehído sobre las muestras fijadas durante 10 min a temperatura ambiente. Después de retirar el glutaraldehído, se lavaron las preparaciones repetidas veces con tampón PBS durante 5 min. A continuación, se cubrieron las muestras con isopropanol al 2 % durante 10 min y sin eliminar el alcohol, se añadieron 10 μ L de faloidina (P-5282, Sigma), marcada con ITCF. Transcurrida una hora en oscuridad, se procedió a eliminar el exceso de faloidina-ITCF mediante sendos lavados con tampón fosfato salino (PBS). El montaje de las preparaciones se llevó a cabo en un portaobjetos con una gota de 30 μ L Mowiol-Dabco (Sigma, D2522) para evitar el decaimiento de la fluorescencia. Se colocó el cubreobjetos sobre las muestras y a continuación se guardaron las preparaciones en oscuridad a 4 °C durante 12 h.

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRE-2 para la captación de imágenes correspondientes al marcaje de las células y un láser argon-krypton de 75 mW. Se utilizó un objetivo Leitz Plan-Apocromático de 63 x (N.A 1,4 en aceite de inmersión). El fluorocromo utilizado fué excitado por una luz láser seleccionada a una longitud de onda de 488 nm y detectado con longitudes de ondas que incluyen los rangos de emisión 520-540 nm. El tamaño de las imágenes fue de 838 x 838 nm. Se analizaron 15 células por tratamiento, se obtuvieron secciones ópticas de 0,2 μm de grosor hasta un total de 50 y se generaron imágenes de proyección 3-D de tipo extended focus (Wilson, 1990).

La intensidad de la fluorescencia se calculó a partir de las proyecciones 3-D de tipo extended focus. Para cuantificar la intensidad, se utilizó el programa de análisis de imágenes Leica Confocal software y la superficie (en pixels) que ocupa cada célula se definió como una región ROI (region of interest). Para expresar la intensidad de fluorescencia se utilizó la intensidad de fluorescencia máxima, mínima y media emitida por pixel.

13. ESTUDIO PROTEICO A PARTIR DE CIANOBIONTES DE *P. CANINA*

13.1. Actina o proteínas homólogas

13.1.1. Obtención del contenido proteico

Cianobacterias recién aisladas (20 mg), fueron sometidas a una lisis para obtener el contenido proteico de las mismas para ello se utilizó 100 μL de tampón de lisis que contenía: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 1% (v/v), cóctel inhibidor de proteasas (complete TM, Roche) al 1x1.000 (v/v) y DDT 0,2 M. Las muestras fueron sometidas a una disrupción ultrasónica de 40 $\text{Hz}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 1 s alternando con paradas de 1 s durante 2 min. Posteriormente se centrifugo a $20.200 \times g$ durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue hervido a 95 °C durante 5 min.

13.1.2. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas presentes en la muestras con el BIO-Rad-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kit. Para ello se realizó una curva patrón con proteína BSA a concentraciones conocidas de 1, 2, 3, 4 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todas las muestras fueron estas diluidas en una solución 1:5 Bio-rad protein y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (ULTROSPEC 2000).

13.1.3. Separación de proteínas por SSD-PAGE para la identificación de actina o proteínas homólogas

La separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Laemmli, 1970) se llevo a cabo en un sistema Mini-Protean®3 de Bio-Rad con geles de 1 mm de grosor. Para determinar la existencia de proteínas el gel separador (poliacrilamida al 10 %) contenía 2 mL de agua destilada, 3,3 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 1,3 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 50 μL de SDS al 10% (p/v) y en el último momento se adicionaron 50 μL de persulfato amónico al 10 %(p/v) y 2 μL de TEMED (N',N', N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano).

Para el gel concentrante, preparado al 5 % en todos los casos, contenía 1,36 mL de agua destilada, 0,34 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 0,26 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M a pH 6,8, 260 μL de SDS al 10 % (p/v) y en el último momento se adicionaron 20 μL de persulfato amónico al 10 %(p/v) y 2 μL de TEMED.

Las muestras se cargaron en una disolución conteniendo tampón Laemmli (Tris-HCl 65 mM a pH 6,8, glicerol al 20 % (v/v), SDS al 5 % (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (v/v) y β -mercaptoetanol 250 mM). Se utilizaron 40, 20 y 10 μg de extracto proteico obtenido a partir de cianobacterias recién aisladas. Para determinar el peso molecular de las muestras se cargó la mezcla de proteínas Precision plus, *protein kaleidoscope Standards* cat 161-0375, mezcla de proteínas fluorescentes con pesos comprendidos entre 10-250 kD (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250). Como control positivo se utilizaron 10 μg células embrionarias de fibroblastos de ratón de 10,5 días (Tondeleir *et al.*, 2012).

Sometiéndolas a una corriente eléctrica de voltaje constante (28 mA) durante 1 h. El tampón de corrida empleado fue Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 1 % (p/v). Después de la separación electroforética de las proteínas por su peso molecular, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Amersham Biosciences) por electroelución o movilidad electroforética, sometiendo a las muestras a una corriente eléctrica constante (26 V) durante toda la noche. El tampón de transferencia empleado fue Tris base 25 mM pH 8,3 y glicina 150 mM.

Una vez terminada la transferencia, se seco durante 1 h a 4 °C. La membrana, con la cara transferida hacia arriba, fue bloqueada con tampón PBS y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Pasado este tiempo se incubaron las membranas con el anticuerpo primario policlonal o monoclonal cada uno de los cuales reconoce uno o varios epítomos específicos de la proteína que se desea visualizar (una membrana por anticuerpo):

- Anti-pan-actina de conejo (Sigma A2066), anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.
- Anti- β -actina de ratón (Sigma A5441), anticuerpo monoclonal diluido 1/3.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.
- Anti- β -actina de ratón (Sigma A2228), anticuerpo monoclonal diluido 1/1.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.
- Anti- α -actina de ratón (Abcam, ab 40863), anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.
- Anti- α -actina de ratón (Sigma A5228), anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.

Durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después se lavó 3 veces durante 5 min con tampón PBS-tween al 1 %. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El anticuerpo secundario fue, según el primer anticuerpo utilizado:

- Anti-mouse IRDye 800 diluido 1/10.000 en PBS y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.
- Anti-rabbit IRDye 800 1/10000 en PBS y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrared Imaging system) en proporción 1:1.

Después fueron sometidos a varios lavados:

- 5 veces, 5 min con PBS-Tween.
- 1 vez, 5 min PBS.
- 1 vez, 5 min con agua milli-Q.

Las bandas obtenidas fueron escaneadas con el escanner Odyssey y analizadas con el programa Odyssey V3.0.

13.1.4. Revelado de los geles de electroforesis

El revelado del gel se realizó con azul coloidal Coomassie (Gel Code Blue stain reagent, Pierce, Rockford, IL, USA). El gel fue sumergido en una solución que contenía azul de Coomassie G-250 al 0,25 % (p/v), metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) todo ello disuelto en agua milli-Q durante 10 min con agitación suave.

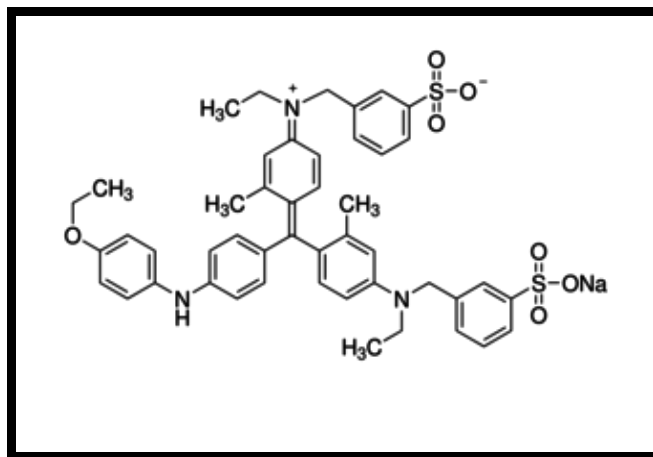


Figura 36. Molécula de azul de Coomassie (Sigma-Aldrich).

A continuación se retiró el tinte y se procedió a la destinción del gel en una solución de metanol al 40 % durante 12 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalmente, el gel fue secado a vacío y escaneado después con el scanner Odyssey y analizado con el programa Odyssey V 3.0. Para su conservación se guardó sumergido en agua milli-Q.

13.1.5. Electroforesis 2D para el estudio de la actina o proteínas homólogas

La electroforesis 2D, es un proceso de separación de mezclas complejas de proteínas en dos dimensiones. Las moléculas son separadas por su carga o punto isoeléctrico (pI) por la técnica de enfoque isoeléctroenfoque o IEF (Isoelectric Focusing), que constituye la primera dimensión. La separación de las proteínas en la segunda dimensión se realiza de manera perpendicular a la primera, de acuerdo a su tamaño o masa molecular por electroforesis en SDS PAGE.

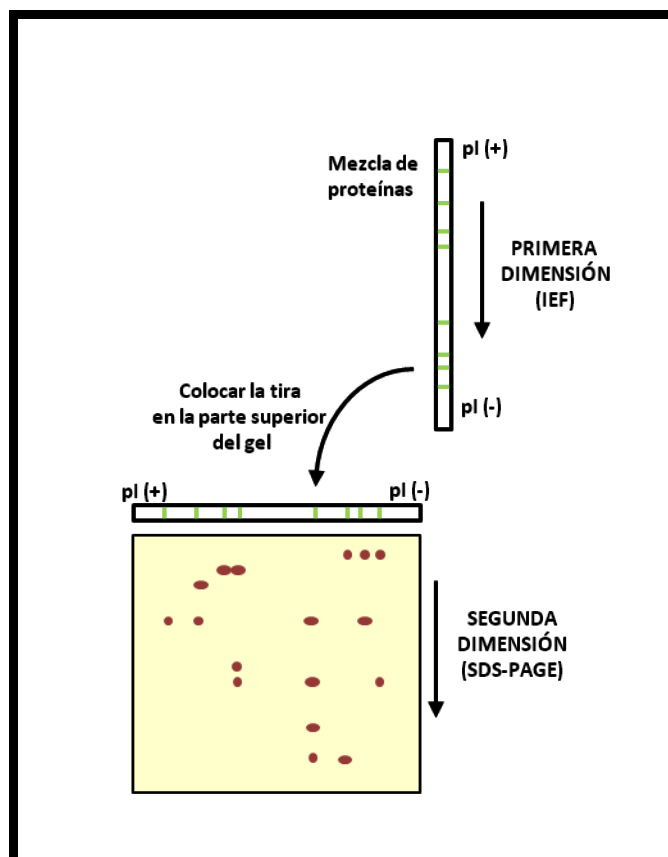


Figura 37. Representación esquemática de la técnica de electroforesis bidimensional. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico. A continuación, las proteínas se separan en base a su masa molecular por electroforesis.

Se realizaron 3 electroforesis 2D en tándem, una de ellas fue revelada con azul de Coomassie (Gel Code Blue stain reagent, Pierce, Rockford, IL, USA), mientras que las otras dos fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con los anticuerpos anti- β -actin mouse (Sigma A2228) y anti- α -actin mouse (Abcam, ab40863) respectivamente.

Para la primera dimensión, se utilizaron tiras de gel inmóvilne drystrips (Amersham Pharmacia Biotech) de 11 cm de largo. Consisten en unas delgadas tiras de gel de poliacrilamida como un tamiz molecular que contienen un gradiente de pH inmovilizado (IPG), que garantiza gradientes de pH extremadamente estables permitiendo mayor reproducibilidad. El rango lineal de pH utilizado se encontraba entre pH 4 y 7. Se añadió tapón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 1% (v/v), cóctel inhibidor de proteasas (complete TM, Roche) al 1x1.000 (v/v) y DDT 0,2 M) a las muestras que se iban a analizar hasta completar el volumen recomendado de carga en las tiras IPG, 200 μ L para tiras de 11 cm. En todos los casos se utilizaron 100 μ g de extracto proteico extraído a partir de cianobiontes de *P. canina*. Antes de realizar la primera dimensión, se añadió a la muestra tampón IPG, pH 4-7 (Amersham Pharmacia Biotech) al 1 % (v/v). Puestas las muestras en los soportes para el gel, fueron repartirlas por toda la superficie. A continuación se puso en el soporte la tira IPG con la cara del gel hacia abajo y se cubrió con aceite Plus-one Drystrip cover fluid (Amersham Parapharmacia Biotech) hasta cubrir completamente para evitar así la evaporación de la muestra durante el proceso.

A continuación se realizó el isoelectroenfoco en un sistema IPGphor (Amersham Parapharmacia Biotech) que constaba de varios pasos:

- Rehidratación a 10 V durante 11 h.
- 300 V durante 1 h.
- Gradiente desde 300 hasta 6.000 V durante 3 h.
- 6.000 V durante 9 h.
- 8.000 V durante 1 h.

Después del IFT, fue necesario equilibrar las tiras IPG, con el fin de permitir la solubilización de las proteínas previamente enfocadas y de una completa interacción de las proteínas con el dodecil sulfato sódico (sodium dodecyl sulfate, SDS) de la segunda dimensión. El equilibrio se llevó a cabo con tampones reductores que contenían SDS y idioacetamida/DTT para asegurar que las proteínas están

completamente cubiertas con SDS y las cisteínas están reducidas y alquiladas (Gorg *et al.*, 2004). El tampón utilizado fue el siguiente: Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30 % y SDS 1 %. En el primer equilibrio se añadió 10 mg de DDT/10 mL al tampón de equilibrio y se lavaron las tiras IPG durante 15 min a temperatura ambiente. En el segundo equilibrio fueron utilizados 0,45 g de iodoacetamida/ 10 mL y el tiempo de lavado fue el mismo. Una vez que las proteínas fueron separadas en función de sus propiedades eléctricas, pasamos a separarlas en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de dodecil-sulfato sódico (SDS). Todo el proceso se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN 3 de Bio-Rad con geles de 1 mm de grosor.

El gel separador contenía 2 mL de agua destilada, 3,3 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 1,3mL de tampón Tris 1,5 M, pH 8,8, 50 µL de SDS al 10 % (p/v) y en el último momento se adicionaron 50 µL de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 2 µL de TEMED. Para el gel concentrante, preparado al 5 %, se utilizaron: 0,68 mL de agua destilada, 0,17 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 0,13 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8, 130 µL de SDS al 10 % (p/v) y en el último momento se adicionaron 10 µL de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 1 µL de TEMED.

Las tiras se pusieron en contacto con el gel concentrador. Para determinar el peso molecular de las muestras se cargó la mezcla de proteínas Precisión plus, Protein Kaleidoscope Standards cat 161-0375, mezcla de proteínas fluorescentes con pesos comprendidos entre 10-250 kD en el lado cercano al polo positivo de la tira y 20 µg de extracto de proteínas de cianobacteria en el lado opuesto. Todo ello fue cubierto con agarosa grado (Invitrogen) al 0,8 % (p/v) en tampón de corrida (Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 1 % (p/v)). Las proteínas fueron sometidas a una corriente eléctrica de voltaje constante (56 V) durante 70 min. El tampón de corrida empleado fue Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 1 % (p/v).

Después de la separación electroforética de las proteínas por su peso molecular, uno de los geles obtenidos fue teñido con azul de Coomassie y el otro fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. El revelado del gel se realizó con azul coloidal Coomassie (Gel Code Blue stain reagent, Pierce, Rockford, IL, USA). El gel fue sumergido en una solución que contenía azul de Coomassie G-250 al 0,25 % (p/v), metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) todo ello disuelto en agua milli-Q durante 10 min con agitación suave. A continuación se retiró el tinte y se procedió a la

destinción del gel en una solución de metanol al 40 % durante 12 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Finalmente, el gel fue secado a vacío y escaneado después con el scanner Odyssey. Para su conservación se guardó sumergido en agua milli-Q.

En el resto de los geles, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Amersham Biosciences) por electroelución o movilidad electroforética, sometiendo a las muestras a una corriente eléctrica constante (26 V) durante toda la noche. El tampón de transferencia empleado fue Tris base 25 mM, pH 8,3 y glicina 150mM. Una vez terminada la transferencia, se seco la membrana durante una hora a 4 °C. La membrana con la cara transferida hacia arriba, fue bloqueada con tampón PBS y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrased Imaging system) en proporción 1:1, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Pasado este tiempo se incubaron las membranas con el anticuerpo primario anti- β -actina (Sigma-Aldrich A2228) y anti- α -actina mouse (Abcam, ab 40863) respectivamente. Diluidos ambos 1/1000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1% y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrased Imaging system) en proporción 1:1. Tras varios lavados con PBS-Tween, PBS y agua milli-Q, las bandas obtenidas fueron escaneadas con el scanner Odyssey y analizadas con el programa Odyssey V 3.0.

13.1.6. Localización de actina en el cianobionte

13.1.6.1. Marcaje del citoesqueleto con ferritina

Se realizó un marcaje de la actina presente en los cianobiontes de *P. canina* con anti- β -actina (AC-15: sc69879, TEBUBIO Santa cruz biotechnology, INC) unida a ferritina (Sigma Chem. Co) siguiendo el método de Bayer y colaboradores (1976) con modificaciones. Una solución equimolar de ferritina y anti- β -actina se incubaron en glutaraldehído 0,05 % (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla fue alcalinizada con 1M de bicarbonato de amonio y dializada toda la noche frente a tampón PBS a 4 °C. Los agregados de alto peso molecular (ferritina-glutaraldehído-ferritina) fueron eliminados por centrifugación del dializado a $10.000 \times g$ durante 30 min a 2 °C. El sobrenadante fue centrifugado a $22.000 \times g$ durante 3 h, el precipitado obtenido, que contenía la fracción ferritina-glutaraldehído- anti- β -actina (AC-15), fue resuspendido en 5 mL de tampón.

13.1.6.1. Localización de actina con anti- β -actina unida a ferritina

Cianobacterias aisladas fueron incubadas durante 30 min con 1,5 mg de ferritina- anti- β -actina actina (AC-15, TEBUBIO Santa cruz Biotechnology, INC) en 2 ml de tampón PBS a 26° C. Posteriormente las cianobacterias fueron recuperadas mediante centrifugación a $5.000 \times g$ durante 10 min y lavadas a continuación con tampón PBS. Las cianobacterias marcadas fueron analizadas por microscopía de transmisión. El método de preparación de las muestras es el convencional para la detección citoquímica mediante microscopía de transmisión descrito en el apartado 10.2. Microscopía de transmisión. Previamente al marcaje las cianobacterias fueron incubadas con lectina fúngica $0,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ durante 4 h, tanto en presencia como en ausencia de latrunculina-A $10 \text{ } \mu\text{M}$. Las células control no fueron expuestas a la anti- β -actina unida a ferritina ni a la lectina fúngica.

13.1.7. Microscopía confocal

Cianobiontes de *P. canina* fueron incubados en presencia de latrunculina-A $10 \text{ } \mu\text{M}$, hacia un capilar conteniendo 20 mg de lectina purificada a partir del mismo liquen durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a $5.000 \times g$ durante 10 min y procesadas (Heath, 1987) para ser analizadas mediante microscopía confocal. Una gota de $30 \text{ } \mu\text{L}$ de polilisina $1,0 \text{ } \mu\text{M}$ fue depositada sobre un cubreobjetos durante 8 h en una cámara de humedad, evitando la desecación en todo momento. Transcurrido este tiempo se retiró la polilisina no fijada con un capilar y se colocaron sobre el cubre $100 \text{ } \mu\text{L}$ de suspensión de cianobacterias *Nostoc* sp. 3 cubres por tratamiento. Después de 2 h se retiró el resto del medio y las cianobacterias no fijadas.

Se depositaron $30 \text{ } \mu\text{L}$ de glutaraldehído sobre las muestras fijadas durante 10 min a temperatura ambiente. Después de retirar el glutaraldehído, se lavaron las preparaciones repetidas veces con tampón PBS durante 5 min. A continuación, se cubrieron las muestras con isopropanol al 2 % durante 10 min y sin eliminar el alcohol, se añadieron $10 \text{ } \mu\text{L}$ de faloidina-Alexa Fluor® 488 (P-8878, Cell signal). Transcurrida una hora en oscuridad, se procedió a eliminar el exceso de faloidina mediante sendos lavados con PBS. El montaje de las preparaciones se llevó a cabo en un portaobjetos con una gota de Prolong® evitando el decaimiento de la fluorescencia. A continuación

se colocó el cubreobjetos con las muestras. Se guardaron las preparaciones en oscuridad a 4°C durante 12 h.

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leica DMI-6000 para la captación de imágenes correspondientes al marcaje de las células y un láser argon-krypton de 75 mW. Se utilizó un objetivo Leica Plan-Apocromático de 100 x (N.A 1,4 en aceite de inmersión). El fluorocromo utilizado fué faloidina Alexa Fluor 488® (Sigma), excitado por una luz láser seleccionada y detectado con longitudes de ondas que incluyen los rangos de emisión 520-540 nm. El tamaño de las imágenes fue de 838 x 838 nm. Se analizaron 15 células por tratamiento, se obtuvieron secciones ópticas de 0,2 µm de grosor hasta un total de 50 y se generaron imágenes de proyección 3-D de tipo extended focus (Wilson, 1990).

13.2. Identificación de miosina o proteínas homólogas

13.2.1. Obtención del contenido proteico

Cianobacterias recién aisladas (20 mG), fueron sometidas a una lisis para obtener el contenido proteico de las mismas para ello se utilizó 500 µL de tampón de lisis que contenía: cloruro de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM, triton 100x al 0,5 % (v/v), cóctel inhibidor de proteasas (complete TM, Roche) al 1x1.000 (v/v) y BME 0,2 M. Las muestras fueron sometidas a una disrupción ultrasónica de 40 Hz·s⁻¹ durante 1 s alternando con paradas de 1 s durante 2 min. Posteriormente se centrifugo a 20.200 × g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue hervido a 95 °C durante 5 min.

13.2.2. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas presentes en la muestras con el método de Lowry y colaboradores (1951). Se tomaron 1 mL de cada muestra, y se procedió a la valoración de proteínas con el reactivo de Folin midiendo la densidad óptica a 500 nm. Como patrón se empleó bovina seroalbúmina (0,1 mg·mL⁻¹).

13.2.3. Separación de proteínas por SSD-PAGE para la identificación de miosina o proteínas homólogas

La separación de las proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en dos geles de poliacrilamida al 7 % (análisis de cadenas pesadas de la miosina) y 15% (análisis de cadenas ligeras de la miosina) en presencia de SDS (Laemmli, 1970).

Los geles utilizados fueron de 1 mm de grosor. El gel separador para el estudio de las cadenas pesadas de miosina con poliacrilamida al 7 % contenía: 5,2 mL de agua destilada, 2,3 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 2,5 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 100 µL de SDS al 10 % (p/v) y en el último momento se adicionaron 50 µL persulfato amónico al 10 % (p/v) y 2,5 µL de TEMED. En el caso de los geles al 15 % utilizados para las cadenas ligeras de miosina: 2,5 mL de agua destilada, 5 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v) y el resto de los componentes en las mismas proporciones .

Para el gel concentrante, preparado al 5 % en todos los casos, contenía 1,36 mL de agua destilada, 0,34 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 0,26 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M a pH 6,8, 260 µL de SDS al 10 % (p/v) y en el último momento se adicionaron 20 µL de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 2 µL de TEMED.

Las muestras se cargaron en una disolución conteniendo tampón Laemmli (Tris-HCl 65 mM a pH 6,8, glicerol al 20 % (v/v), SDS al 5 % (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (v/v) y β-mercaptoetanol 250 mM). Se utilizaron 50 µg de extracto proteico obtenido a partir de cianobacterias recién aisladas. Para determinar el peso molecular de las muestras se cargó la mezcla de proteínas BlueStar PLUS Prestained Protein Marker Tris-Glycine 4-20 % (Cat: MWP04) con pesos comprendidos entre 11-245 kD (11, 17, 20, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135, 180, 245). Como control positivo se utilizaron 5 µg células de ovario de hámster chino (Vicente-Manzanares *et al.*, 2007).

Las proteínas fueron separadas mediante la aplicación de un campo eléctrico de 140 mA durante 50 min en cubetas Mini-Protean®3 (BioRad). El tampón de corrida empleado fue Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 1 % (p/v). Después de la separación electroforética de las proteínas, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Amersham Biosciences) por movilidad electroforética,

sometiendo a las muestras a una corriente eléctrica constante (350 mA) durante 75 min. El tampón de transferencia empleado fue Tris base 25 mM pH 8,3 y glicina 150 mM. Una vez terminada la transferencia, La membrana fue bloqueada con tampón BSA al 2 % (p/v) en tampón TBS durante 1 h, realizando a continuación 3 lavados con TBS de 5 min cada uno.

Pasado este tiempo se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (una membrana por anticuerpo):

- Para cadenas pesadas de miosina:
 - Anti-miosina de conejo (músculo esquelético y liso) deslipidizada, (Sigma M7648), diluido 1/10 en en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti-MNHC II A de ratón (Covance PRB-440P), anticuerpo policlonal diluido 1/2000 en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti-MNHC II B de ratón (Covance PRB-445P), anticuerpo policlonal diluido 1/2000 en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti-MNHC II A de ratón (Anaspec 55308), anticuerpo policlonal diluido 1/200 en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti-MNHC II B de ratón (Anaspec 55309), anticuerpo policlonal diluido 1/200 en tampón TBS-tween al 1 %.
- Para cadenas ligeras de miosina:
 - Anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Rockland Biochemical 600-401-938) anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Cell Signaling 3671) anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en tampón TBS-tween al 1 %.
 - Anti- miosina MLC2 (Thr18/Ser19) de conejo (Cell Signaling 3672) anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en tampón TBS-tween al 1 %.

- Anti- fosfo miosina MLC (Thr18/Ser19) de conejo (Cell Signaling 3674), anticuerpo policlonal diluido 1/1.000 en tampón TBS-tween al 1 %.
- Anti- miosina MYH2 (N2.261) de ratón (Santa Cruz sc-53096), anticuerpo monoclonal, diluido 1/500 en tampón TBS-tween al 1 %.
- Anti-miosina MYH1/2/3 (N3.36) (Santa Cruz sc-53092), anticuerpo monoclonal, diluido 1/500 en tampón TBS-tween al 1 %.
- Anti- miosina MLC (Clon MY-21) de conejo (Sigma M4401) anticuerpo monoclonal diluido 1/500 en tampón TBS-tween al 1 %.

Durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después se lavó 4 veces durante 5 min con tampón TBS-tween al 1 %. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario fue, según el primer anticuerpo utilizado:

- Anti-mouse conjugado con peroxidasa (Pierce) diluido 1/5.000 tampón TBS-Tween 0,1 %.
- Anti-rabbit conjugado con peroxidasa (Pierce) diluido 1/5.000 en tampón TBS-Tween 0,1 %.

La incubación con el anticuerpo fue llevada a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron lavadas con 20 mL de TBS-Tween al 0,1 % durante 10 min hasta un total de 4 veces y se revelaron usando el sistema de quimioluminiscencia SuperSignal Pico (Pierce) en un sistema de adquisición de imagen General Electric LAS-4000. La imagen de la membrana revelada fue analizada utilizando el programa ImageJ.

13.2.4. Estudio de la fosforilación de miosina o proteínas homologas en los cianobiontes

Mediante la utilización del anticuerpo de conejo anti-fosfo miosina MLC (Ser 19) (Rockland Biochemical 600-401-938) se ha estudiado las variaciones de fosforilación de la miosina en los cianobiontes en función del tiempo de contacto con la lectina

fúngica. El anticuerpo de fosfo-miosina de cadena ligera detecta los niveles endógenos de la cadena ligera de la miosina II solamente cuando está fosforilada en la serina 19.

Cianobiontes previamente aislados fueron incubados con una suspensión de 1 mL de lectina segregable obtenida a partir de talos de *P. canina* durante 10, 30, 60 y 240 min en agitación suave y temperatura ambiente. A continuación, fueron centrifugados a $5.000 \times g$ durante 10 min, la pella obtenida fue utilizada para la identificación de miosina tal y como aparece en el apartado 13.2. Identificación de miosina o proteínas homólogas, utilizando geles del 15 %. Se determinó el tiempo en el que la fosforilación era mayor mediante la cuantificación por densitometrado utilizando el programa ImageJ, en función del grosor de las bandas obtenidas por electroforesis y posterior marcaje con el anticuerpo.

13.2.5. Localización de miosina en el cianobionte con anti-fosfo miosina MLC (Ser 19)

Se realizó un marcaje de la miosina presente en los cianobiontes de *P. canina* con anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Rockland Biochemical 600-401-938) unido a un anticuerpo secundario fluorescente y posteriormente analizados mediante microscopía electrónica.

Para ello, cianobiontes previamente aislados e incubados con lectina fúngica y lectina fúngica junto latrunculina $10 \mu\text{M}$ durante 4 h, fueron centrifugados a $5.000 \times g$ durante 10 min. A continuación, se cubrieron con isopropanol al 2 % (v/v) durante 10 min y transcurrido dicho tiempo, el total de muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti- fosfo miosina MLC, diluido 1:500 en tampón PBS y saponina 0,1 % (v/v) a 37°C durante 2 h. Después de varios lavados con PBS, las células fueron incubadas en una solución de tampón PBS y saponina 0,1 % (v/v) junto con el anticuerpo secundario de conejo (Pierce) diluido 1/500 y unido al fluorocromo Alexa Fluor® 488, durante 37°C durante 1 h.

De nuevo, se lavaron los cianobiontes con PBS y centrifugados a $5000 \times g$ durante 10 min. El montaje de las preparaciones se llevó a cabo inmediatamente en un portaobjetos con una gota de Prolong®. A continuación se colocó el cubreobjetos con las muestras. Y se analizaron por microscopía confocal utilizando el mismo microscopio del apartado 13.1.7. Microscopía confocal.

14. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LAS CIANOBACTERIAS

14.1. Valoración de la participación del AMPc y GTP en el proceso de desplazamiento de los cianobiontes

Se analizó el efecto del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a concentraciones crecientes (0,2 mM a 24 mM) sobre cianobacterias tratadas con inhibidores de la miosina II y actina, tales como blebistatina (25 μ M) y faloidina (10 μ M).

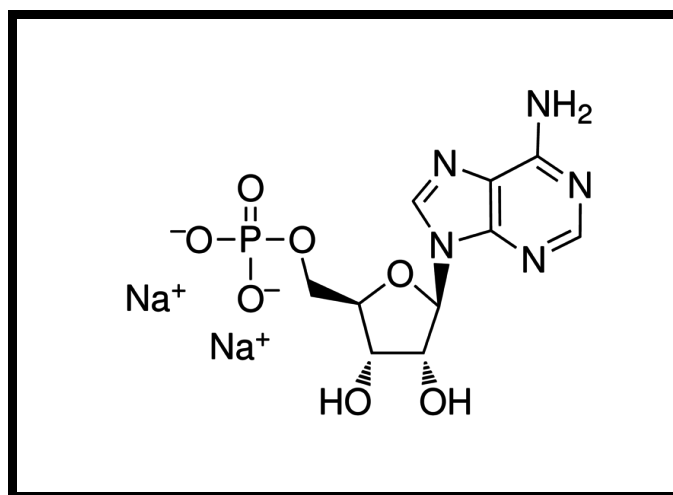


Figura 38. Molécula de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Sigma-Aldrich).

Se añadieron 4,0 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) en varias placas petri y se utilizaron capilares en los que se introdujo 20 μ L de lectina con una concentración de 1mg·mL⁻¹. Mientras que uno de los extremos fue sellado con Blutac®, el extremo abierto se depositó en una placa petri con un inclinación de 45°. Se realizaron diversos experimentos en tándem variando el contenido presente en la placa petri, pero todas ellas contenían 100 μ L de una suspensión de cianobacterias a 4 mm del capilar.

- Control: sin inhibidores.
- Control 2: blebistatina 25 μ M + faloidina 10 μ M.
- Ensayo A1: con inhibidores + AMPc 0,2 mM.
- Ensayo A2: con inhibidores + GTP 1 mM.

- Ensayo A3: con inhibidores + GTP 10 mM.
- Ensayo A4: con inhibidores + GTP 2 5mM.

Así mismo se analizó el efecto del guanosín trifosfato (GTP) a concentraciones crecientes (2 mM a 50 mM) sobre cianobacterias tratadas con inhibidores del movimiento tales como blebistatina (25 μ M) y faloidina (10 μ M).

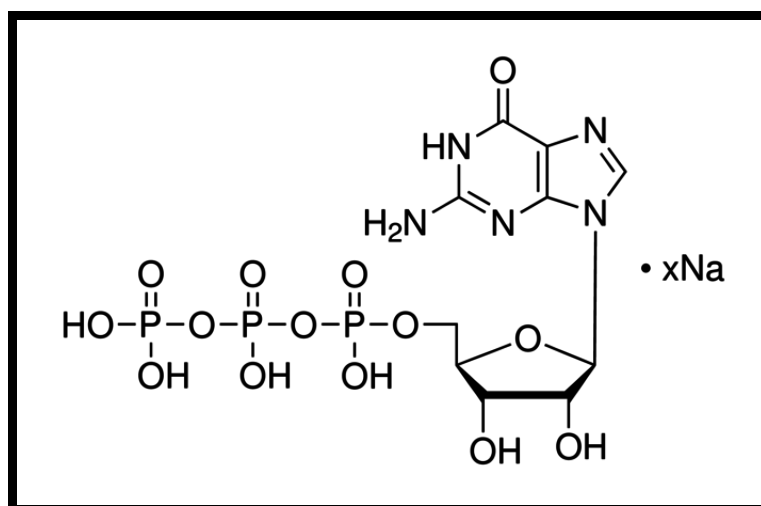


Figura 39. Molécula de guanosín trifosfato (GTP) (Sigma-Aldrich).

Se añadieron 4,0 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) en varias placas petri y se utilizaron capilares en los que se introdujo 20 μ L de lectina con una concentración de 1mg·mL⁻¹. Mientras que uno de los extremos fue sellado con Blutac®, el extremo abierto se depositó en el medio líquido la placa petri con un inclinación de 45°.

Se realizaron diversos experimentos en tándem variando el contenido presente en la placa petri, pero todas ellas contenían 100 μ L de una suspensión de cianobacterias a 4 mm del capilar:

- Control: sin inhibidores.
- Control 2: blebistatina 25 μ M + faloidina 10 μ M.
- Ensayo G1: con inhibidores + GTP 2 mM.
- Ensayo G2: con inhibidores + GTP 10 mM.
- Ensayo G3: con inhibidores + GTP 10 mM.

A continuación todas las placas fueron cubiertas para evitar la luz, las corrientes de aire así como minimizar la evaporación. La totalidad de las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 4 h. Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados por la superficie exterior. El contenido de dichos capilares fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

14.2. Efecto de análogos del GTP como GTP γ (s) y GDP β (s) sobre cianobacterias tratadas con blebistatina y faloidina

Se analizó el efecto de GTP (50 mM) y fue comparado con el efecto producido por análogos tales como GTP γ (s) (22 mM) y GDP β (s) (5 mM). Se añadieron 4,0 mL de tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) en varias placas petri y se utilizaron capilares en los que se introdujo 20 μ L de lectina con una concentración de 1mg·mL⁻¹. Se realizaron diversos experimentos en variando el contenido presente en la placa petri, aunque todas ellas contenían 100 μ L de una suspensión de cianobacterias a 4 mm del capilar:

- Control 1: sin inhibidores.
- Control 2: con GTP 50 mM.
- Control 3: con blebistatina 25 μ M + faloidina 0,2 μ M.
- Ensayo con inhibidores y GTP 50 mM.
- Ensayo con inhibidores y GTP γ (s) 22 mM.
- Ensayo con inhibidores y GDP β (s) 5 mM.

Todas las placas fueron cubiertas para evitar la luz, las corrientes de aire y minimizar la evaporación. La totalidad de las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 4 h. Después de la incubación se recogieron los capilares y el contenido de los mismos fue depositado en un porta y observados bajo el microscopio de campo claro Olympus BX51. El número de células se determinó utilizando el programa Image Tool 20. Se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento, los resultados aparecen como el número medio de células por campo.

RESULTADOS

1. MORFOLOGÍA DE CIANOBIONTES DE *P. CANINA*

Como primera aproximación al estudio de los cianobiontes de *P. canina*, se aislaron y analizaron mediante el microscopio óptico, a partir de muestras rehidratadas de 1,0 g de talo, previamente maceradas, centrifugadas y homogeneizadas en tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% (p/v) PVP 40.000 y 0,25 % (p/v) BSA). Se obtuvo una suspensión de células *Nostoc* sp., de color verde-azulado, redondeadas y con un diametro entre 3-5 μm (Figura 40).

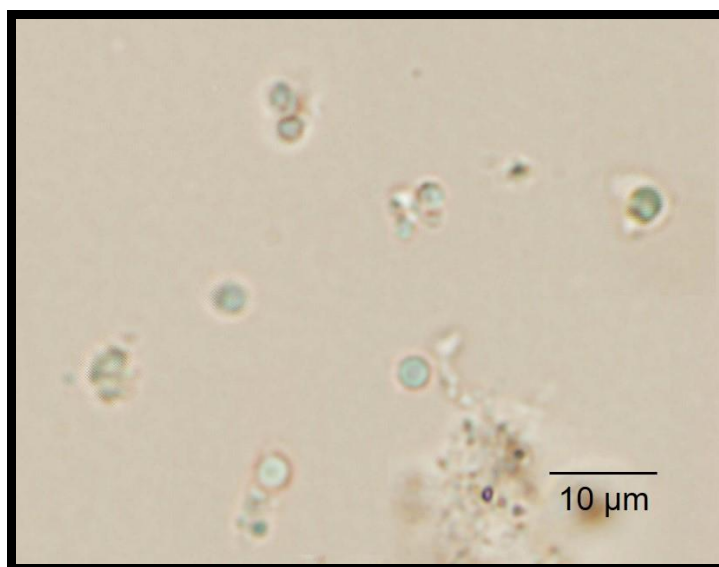


Figura 40. Cianobacterias *Nostoc* sp. aisladas a partir del cianolíquen *Peltigera canina*.

2. DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE LA ENZIMA UREASA

Cianobiontes aislados a partir de talos de *P. canina*, fueron incubados en urea 40 mM durante 2 horas a 30 °C. A continuación, las muestras fueron tratadas con CoCl_2 10 mM durante 30 min a 37 °C, recogidas por centrifugación y procesadas para la detección citoquímica de ureasa. Los cianobiontes produjeron depósitos negros e insolubles de CO_3Co en la pared celular tras la reacción histoquímica, visibles al microscopio óptico. En algunos casos aparecen pequeños depósitos en el interior celular pero siempre cercanos a la pared. Las células no preincubadas con urea no mostraron ningún tipo de precipitado del mismo modo que no aparecía en las células control (Figura 41).

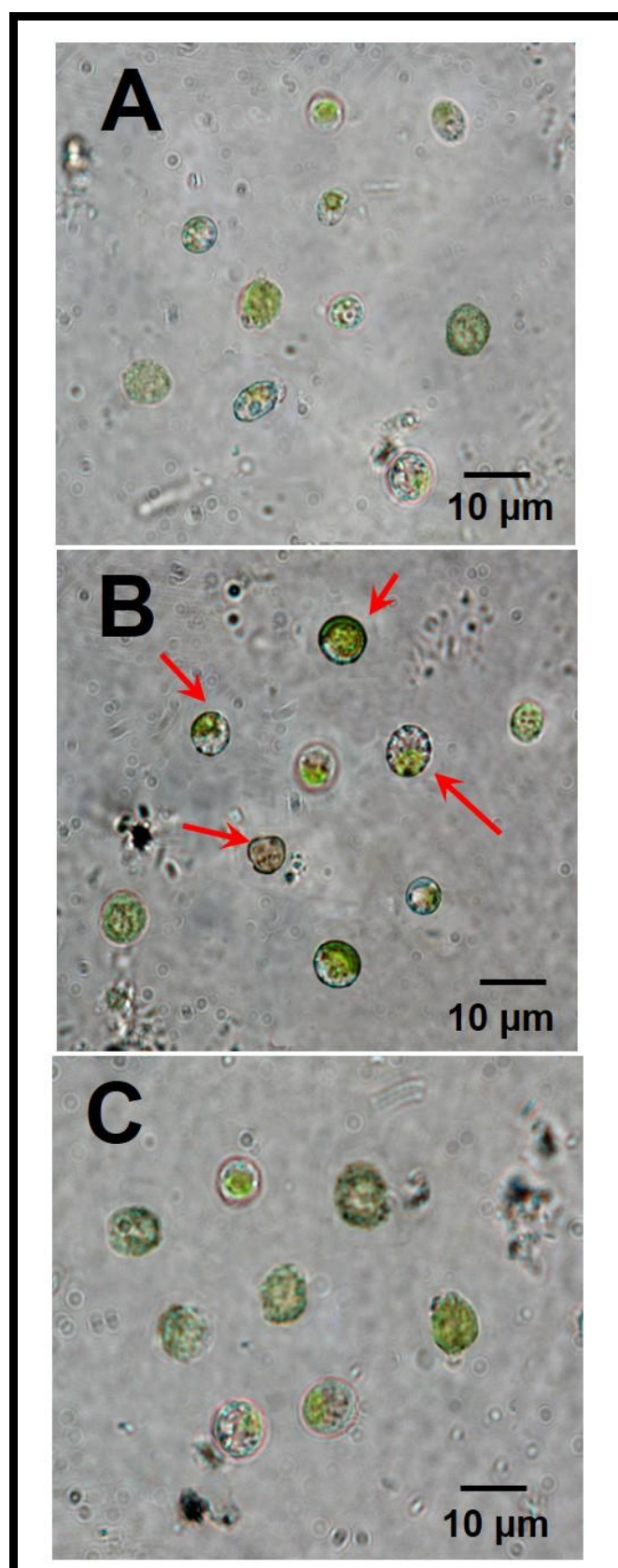


Figura 41. Detección citoquímica de la ureasa de pared. (A) Cianobiontes *Nostoc* recientemente aislados de *P. canina*. (B) Cianobiontes incubados durante 2 horas en urea 40 mM, a continuación en CoCl_2 10 mM y después revelados con CoCO_3 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, los depósitos negros se encuentran localizados en la pared celular (flechas rojas). (C) Cianobiontes tratados para la detección citoquímica sin incubación previamente con urea 40mM.

3. LA LECTINA FÚNGICA DE *P. CANINA* RECONOCE UREASA PURIFICADA DEL LÍQUEN *E. PRUNASTRI*

Para determinar la producción de lectina segregable por parte del cianolíquen *P. canina*, talos liquénicos fueron incubados en placas petri con 20 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,2, conteniendo L-arginina 40 mM que actúa permitiendo la expresión de la proteína, durante 8 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El medio resultante fue filtrado y dializado. La concentración proteica estimada, determinada mediante el método de Lowry, fue de 0,99 mg·mL⁻¹.

Lectinas segregables fueron aisladas por cromatografía de afinidad usando agarosa activada con bromuro de cianógeno conteniendo adherida ureasa purificada de *E. prunastri*. Los extractos obtenidos tras la incubación de *P. canina* durante 8 h en tampón Tris HCl 0,1 M, pH 9,2 conteniendo L-arginina 40 mM, se hicieron pasar por lechos de ureasa-agarosa. Una de los lechos fue eluido con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8, mientras que para otro lecho distinto se utilizó el mismo tampón conteniendo D-galactosa 50 mM, eluyendo en ambos casos fracciones de 2 mL en las que se cuantificaron la cantidad de proteínas totales por el método de Warburg & Christian (1941) y actividad arginasa por el método de microdifusión de Conway.

La elución con α -D-galactosa 50 mM mostro un primer pico de alta actividad de arginasa (5,18 unidades) a los 10 mL, con una cantidad de proteínas en torno a 0,1 mg·mL⁻¹ en todas las fracciones. La mayor actividad arginasa fue recuperada únicamente en las fracciones eluidas con tampón conteniendo galactosa, mientras que del lecho lavado exclusivamente con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8, se eluyeron fracciones con una menor actividad que en ningún caso superó las 1,5 unidades.

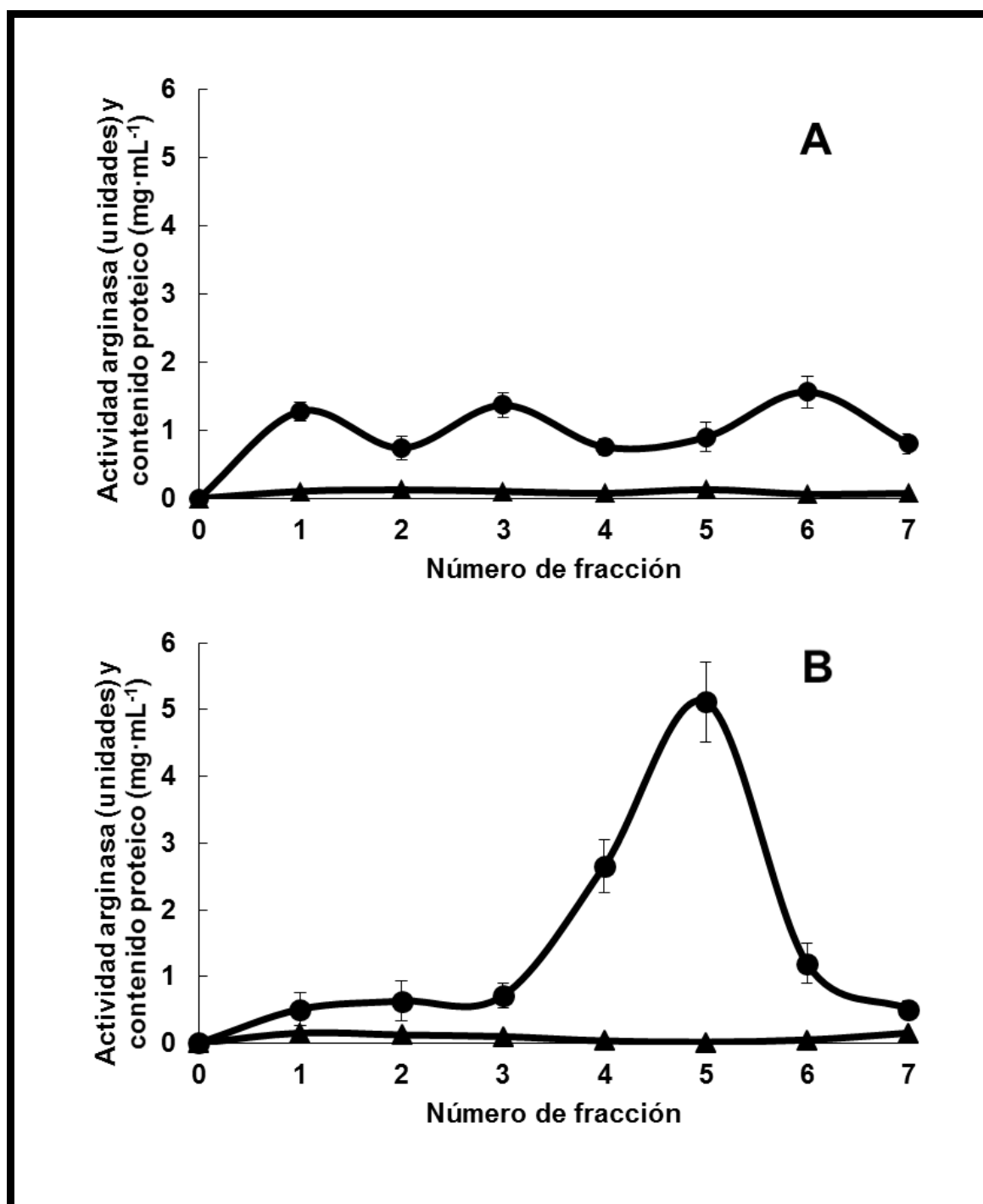


Figura 42. Valoración de la concentración de proteína ▲ y de la actividad arginasa ● (1 unidad = 1 $\mu\text{mol NH}_4^+$ / mg·prot·min) en las fracciones de elución de arginasa de *P. canina* sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa del líquen *E. prunastri*. La elución se llevó a cabo mediante (A) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y (B) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 onteniendo α -D-galactosa 50 mM. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

4. UREASA

4.1. Actividad ureasa positiva en los cianobiontes de *P. canina*

Cianobiontes previamente asilados se resuspendieron en 5 mL de tampón fosfato 10 mM, pH 6,8, conteniendo urea 40 mM para permitir la expresión de la proteína. Seguidamente se incubaron a 30 °C durante 0, 2, 4 y 6 h y a continuación se llevó a cabo el aislamiento de la ureasa. La concentración proteica fue de 0,1 mg·mL⁻¹ para todas las muestras (Tabla II); sin embargo, el máximo de actividad específica se alcanzó a las 2 h de incubación, para disminuir y estabilizarse después a partir de las 5 h de tratamiento (Figura 43).

Tabla II. Valoración de la actividad específica de la enzima ureasa, después de incubar talos de *P. canina* en tampón fosfato 50 mM, pH: 6,8 con urea 40 mM durante 0, 2, 4 y 6 h. La concentración en mg·mL⁻¹ se analizó mediante el método de Warburg & Christian y la actividad específica fue determinada mediante el método Conway utilizando el reactivo de Nessler (1unidad = 1 μ mol NH₄⁺ / mg·prot·min). El valor obtenido es la media de 3 réplicas.

Tiempo incubación (h)	Actividad específica [(μ moles de NH ₄ ⁺ libre· mL ⁻¹ / tiempo de reacción) / mg·mL ⁻¹ de proteína]	[Ureasa] mg·mL ⁻¹
0	0.0052	0.13
2	0.042	0.12
4	0.016	0.11
6	0.01	0.13

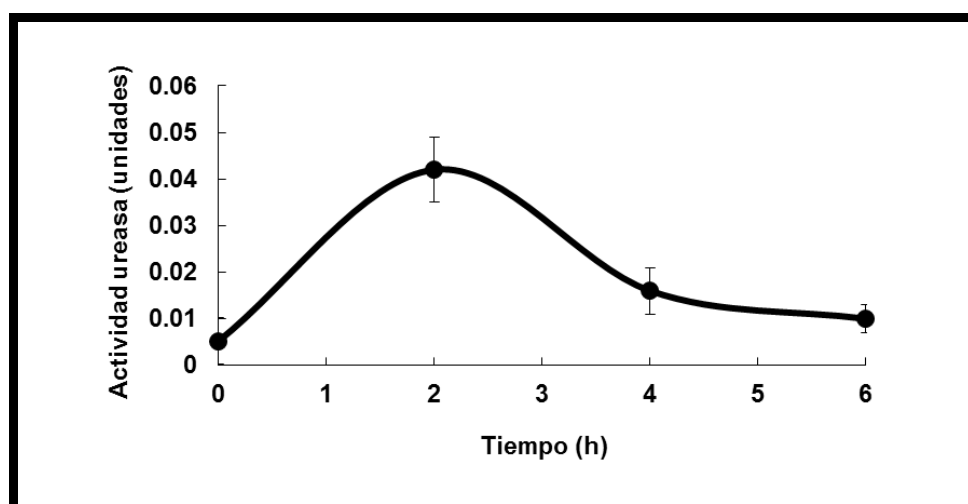


Figura 43. Tiempo de incubación para la extracción de ureasa, extraída a partir de células de *P. canina*, obtenidas a partir de talos flotando en tampón fosfato 50 mM, pH: 6,8, conteniendo 40 mM urea a 30°C en oscuridad. El valor obtenido es la media de 3 réplicas. Medida como actividad específica enzimática (1 unidad = 1 μ mol NH₄⁺ / mg·prot·min). Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

4.2. Residuos específicos de azúcares en la ureasa de pared en los cianobiontes

Se llevó a cabo un análisis mediante cromatografía de afinidad, utilizando ureasa extraída a partir de cianobiontes de *P. canina* incubados con urea 40 mM diluida en tampón fosfato 50 mM, pH 6,8 incubados a 30 °C durante 2 h. Se utilizaron columnas conteniendo garosa activada con bromuro de cianógeno unida a arginasa procedente de talos de del mismo liquen. La agarosa activada unida a arginasa fue empaquetada en columnas sobre las que se añadió ureasa en un volumen final de 2 mL, 2 horas después, una de las columnas fue lavada con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y otra con el mismo tampón conteniendo α -D-galactosa 50mM, obteniéndose 6 fracciones de 2 mL, en las que se cuantificaron la cantidad de proteínas totales por el método de Warburg & Christian (1941) y la actividad uresasa mediante el método de microdifusión de Conway (1962).

La proteína eluida con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y α -D-galactosa 50 mM mostró un primer pico de alta actividad de uresasa en la fracción 1 (Figura 44-B). Cuando la proteína se eluyó con tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 la actividad es baja en la totalidad de las fracciones obtenidas (Figura 44-A), en concreto 1/10 de actividad en relación a la que se obtiene con la elución con α -D-galactosa 50 mM.

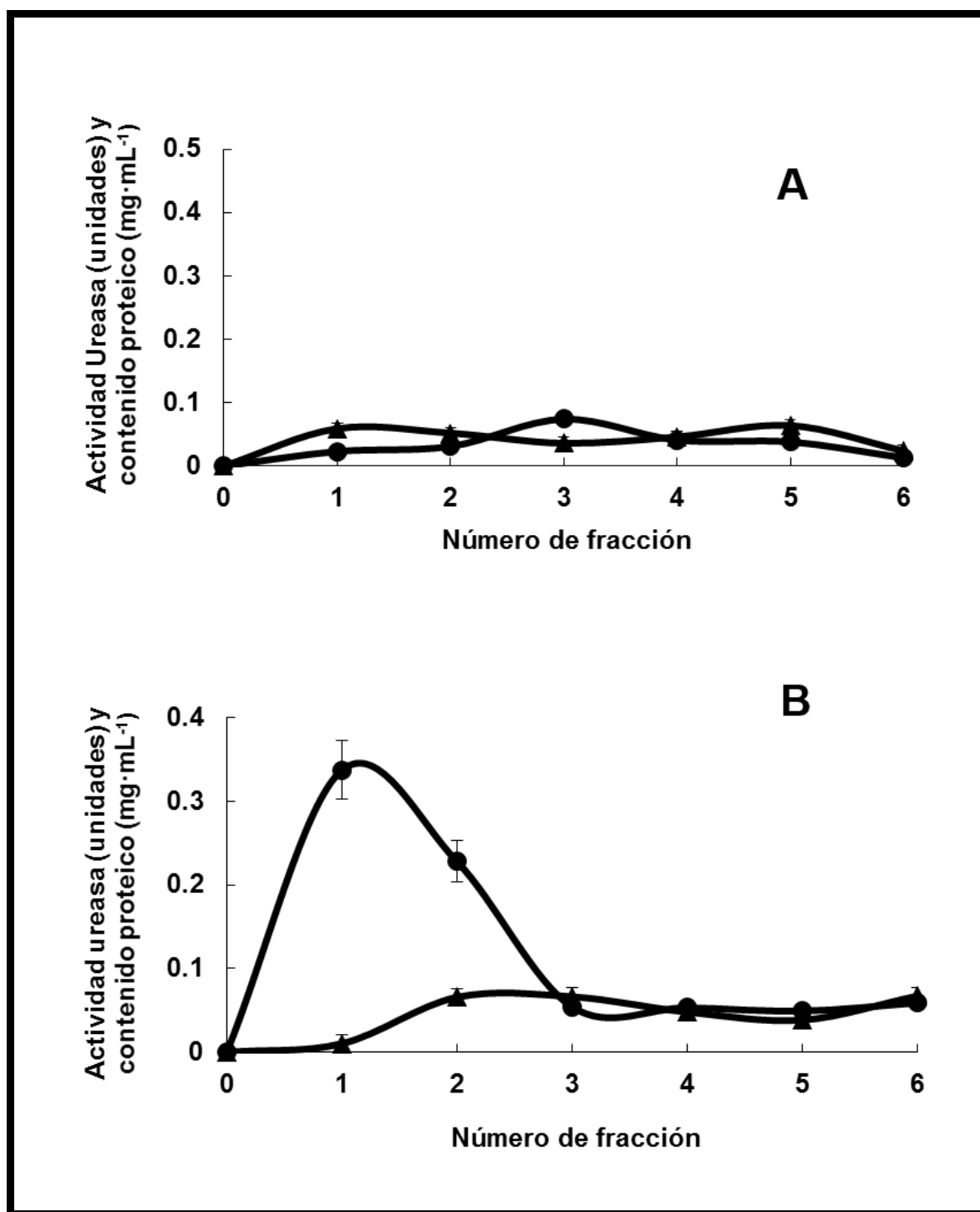


Figura 44. Valoración de la concentración de proteína ▲ y de la actividad ureasa ● (unidad = 1 $\mu\text{mol NH}_4^+$ / mg·prot·min) en las fracciones de elución de la ureasa de *P. canina* sobre lechos de azarosa activada con bromuro de cianógeno con arginasa del mismo líquen. La elución se llevó a cabo mediante (A) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 y mediante (B) tampón fosfato 10 mM, pH 6,8 conteniendo α -D-galactosa 50mM. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

5. ARGINASA SEGREGABLE DE *P. CANINA* RECONOCE UREASA POLIGALACTOSILADA PRESENTE EN LAS PARECES DE LOS CIANOBIONTES COMO LIGANDO

5.1. Unión de lectina marcada con ITCF a los cianobiontes

El marcaje de la lectina fúngica mediante un fluorocromo como el isotiocianato de fluoresceína (ITCF), permite observar mediante microscopía de fluorescencia, las zonas de la pared del fotobionte donde se produce la unión entre lectina y ligando.

La arginasa segregada por los talos de *Peltigera* y marcada con ITCF, fue incubada con cianobacterias aisladas del mismo liquen para después ser observadas por microscopía de fluorescencia. Se reservó una parte de las células para ponerlas después en contacto con α -D-galactosa 50 mM y/o α -D-manosa 50 mM durante 1 h y analizar los niveles de fluorescencia presentes tanto en los cianobiontes como en el sobrenadante de la suspensión celular. Las micrografías de los resultados obtenidos se muestran en la figura 45.

Las células no sometidas a ningún tratamiento, en ausencia de la lectina marcada, mostraron una fuerte autofluorescencia roja debido a las clorofilas foto-excitadas (Figura 45-B). Cuando las cianobacterias fueron incubadas con arginasa-ITCF, se observó una intensa fluorescencia verde (Figura 45-C) en las paredes de los cianobiontes. Sin embargo, las células incubadas posteriormente con α -D-galactosa 50 mM (Figura 45-D) e mostraron una disminución significativa de la fluorescencia en la pared celular. Resultados similares se observaron en las células con α -D-galactosa 50 mM (Figura 45-E).

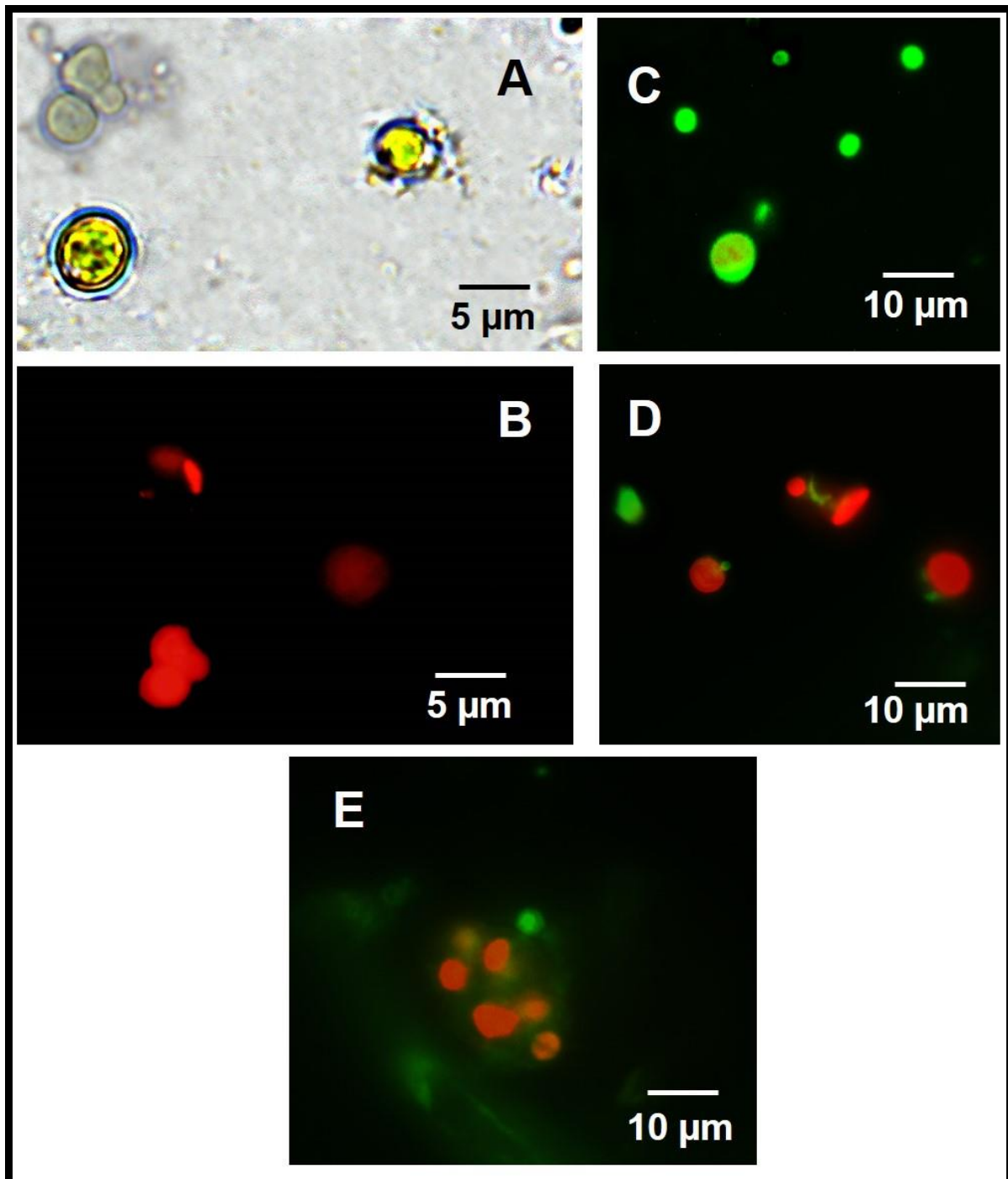


Figura 45. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Nostoc* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-galactosa 50 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia. (E) Cianobiontes incubados con 20 ng de arginasa de *P. canina* y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-manosa 50 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia.

El espectro de excitación y emisión del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, reveló un máximo a 490 y 517 nm respectivamente (Figura 46-A). La fluorescencia relativa

en el sobrenadante Las células *Nostoc* incubadas con arginasa-ITCF presentaron una fluorescencia relativa de 11,2 después de someter a los fotobiontes hasta un total de 10 lavados (Figura 46-B). Así mismo, la fluorescencia aumentó hasta 886 cuando un lote de las cianobacterias fueron incubadas, a continuación, con con α -D-galactosa 50 mM. Cuando los cianobiontes unidos a arginasa-ITFC de *Peltigera* fueron incubados con D-galactosa 50 mM la fluorescencia del sobrenadante se valoró en 380 unidades.

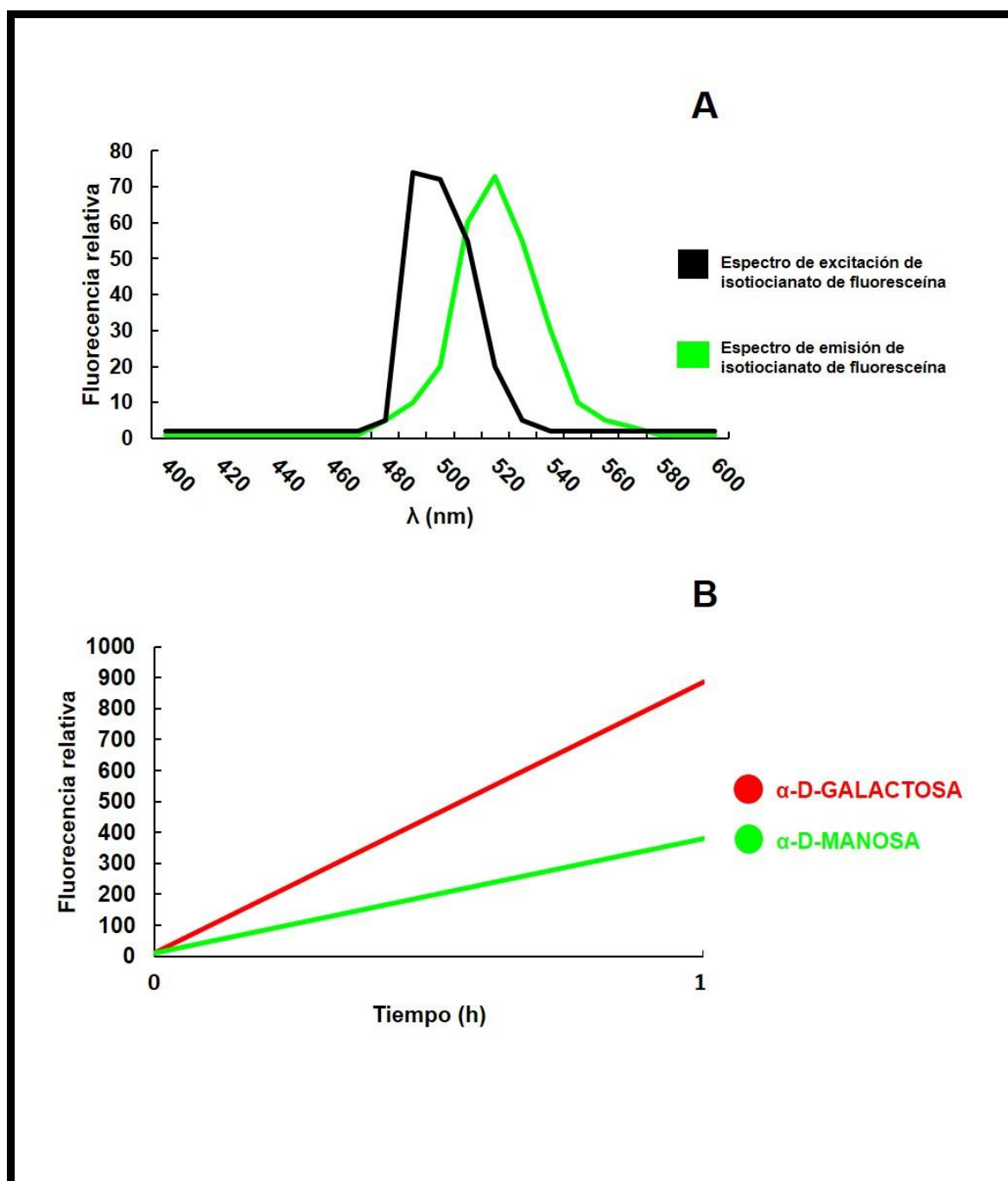


Figura 46. Espectro de excitación y emisión del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína. (B) Fluorescencia relativa en el sobrenadante de fotobiontes de *P. canina* incubadas con arginasa segregable del mismo líquen y marcada con ITCF (tiempo cero) y fluorescencia relativa del sobrenadante después de incubar con el monosacárido galactosa y/o manosa (tiempo 1).

5.2. Arginasa secretada de *P. canina* es capaz de unirse a fotobiontes de *E. prunastri* así como la lectina fúngica de *Evernia* reconoce cianobiontes de *Peltigera*

Clorobiontes de *E. prunastri* se incubaron durante 1 h en presencia de arginasa segregada y purificada ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir de talos de *P. canina* marcada con ITCF. La células de *Trebouxia* sin tratar solo mostraron auto-fluorescencia roja de las clorofilas foto-excitados (Figura 47-B). Cuando los clorobiontes se incubaron con arginasa-ITCF, mostraron una intensa fluorescencia verde (Figura 47-C). La desorción de la lectina de la pared celular se logró mediante la incubación de las células marcadas con α -D-galactosa 100 mM durante 1 h, recuperando así el total de la fluorescencia en el sobrenadante, que fue eliminado con los sucesivos lavados (Figura 47-D). Resultados similares se encontraron cuando los cianobiontes de *P. canina* se incubaron con arginasa marcada de *Evernia* tal y como se observa en la figura 48.

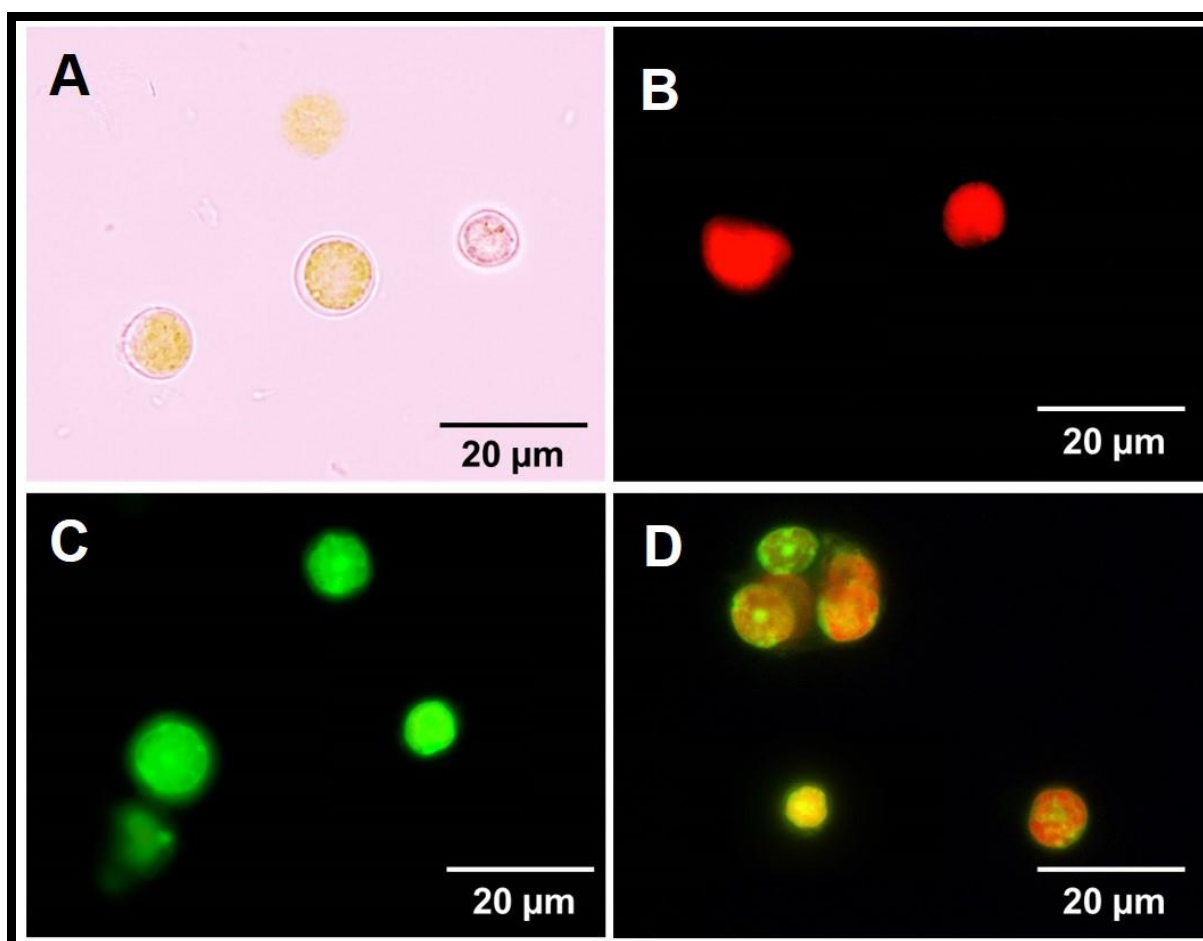


Figura 47. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Trebouxia* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Clorobiontes incubados con de arginasa de *P. canina* ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Clorobiontes incubados con arginasa de *P. canina* ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-galactosa 100 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia.

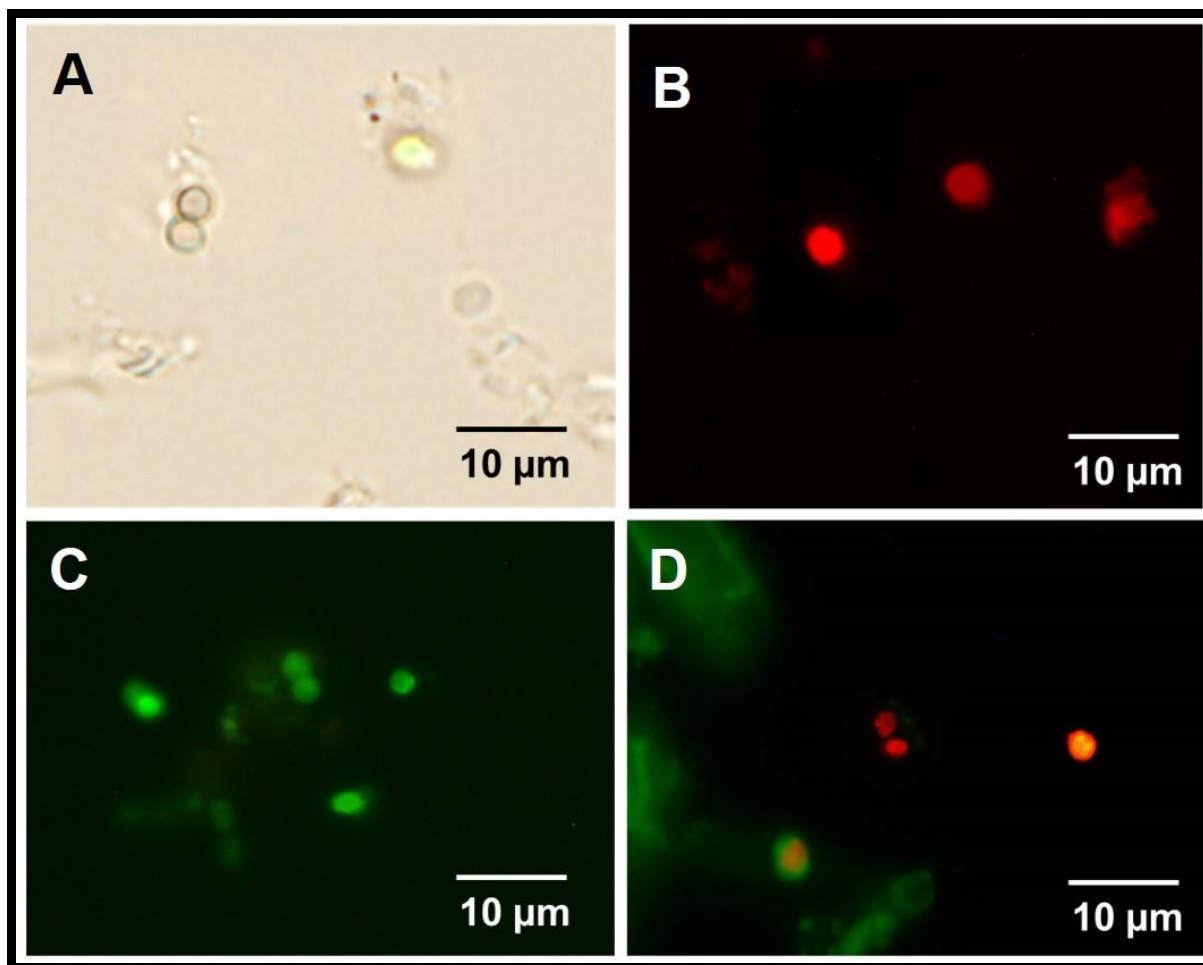


Figura 48. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* sin ningún tratamiento, (A) observados bajo el microscopio de campo claro. (B) Células *Nostoc* sp. no tratadas observadas bajo el microscopio de fluorescencia. (C) Cianobiontes incubados con lectina de *E. prunastri* ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Cianobiontes incubados con arginasa de *P. canina* ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad y tratadas a continuación con α -D-galactosa 100 mM durante 1 h observados bajo el microscopio de fluorescencia.

5.3. La afinidad entre la proteína de reconocimiento y el receptor del fotobionte es diferente para las distintas lectinas fúngicas

La diferencia entre la proteína en el medio antes y después de la incubación fue de $3,32 \text{ mg}\cdot(\text{mL}\cdot\text{gpf})^{-1}$, cuando los cianobiontes de *P. canina* fueron incubados, por primera vez, con arginasa de *E. prunastri*. En el caso de las algas de *E. prunastri* incubadas con arginasa marcada de *P. canina* las diferencia encontrada fue de $3,20 \text{ mg}\cdot(\text{mL}\cdot\text{gpf})^{-1}$.

La fluorescencia relativa en el sobrenadante por gramo de peso fresco de células *Nostoc* incubadas con arginasa-ITCF de *Evernia* fue de 163,3 unidades, después de someter a los fotobiontes hasta un total de 10 lavados (Figura 49). Así mismo, la fluorescencia aumentó hasta 1.553 unidades cuando las cianobacterias fueron incubadas, a continuación, con arginasa del propio talo líquénico. Las algas de *E. prunastri* incubadas con

arginasa-ITCF de *Peltigera* mostraron una fluorescencia en el medio de 366,66 unidades después de 10 lavados consecutivos. Cuando el lote de algas unido a arginasa de *Peltigera* fue incubado con arginasa de *Evernia* sin marcar, la fluorescencia aumento hasta alcanzar un valor de 3.460 unidades. En ambos experimentos, la relación entre la fluorescencia de la segunda incubación (con arginasa del propio liquen) y la primera incubación (con arginasa-ITCF de otra especie) fue de 9,5.

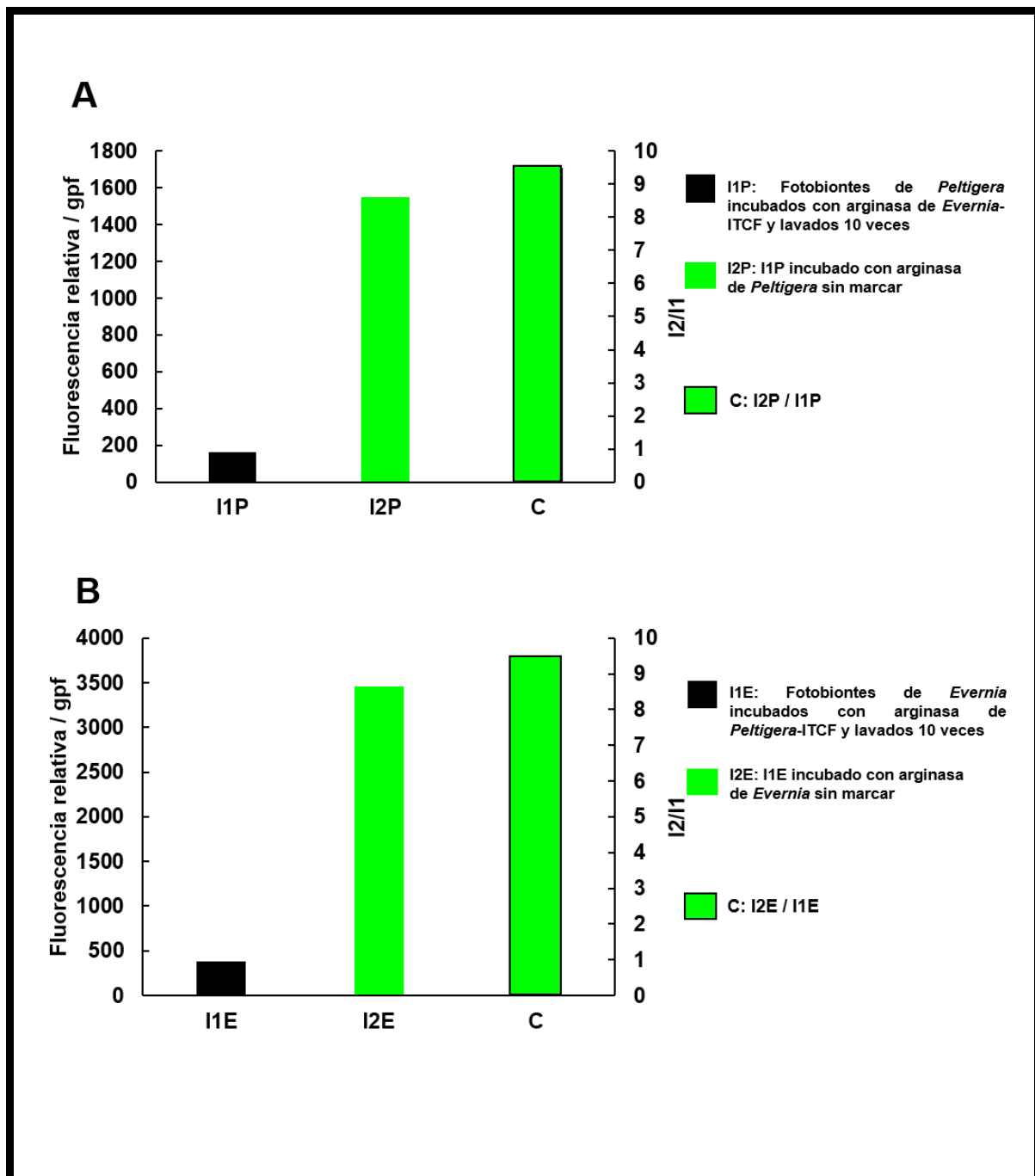


Figura 49. Medida de la emisión de la fluorescencia relativa en el sobrenadante de la incubación de fotobiontes de *P. canina* y *E. prunastri* con arginasa segregable marcada con ITCF. I1 representa los valores de la primera incubación con arginasa marcada del liquen contrario e I2 incubados con arginasa del propio liquen.

5.4. Valoración de azúcares liberados por la acción de la α -galactosidasa sobre la pared celular de los fotobiontes

Los fotobiontes de *P. canina* y *E. prunastri* aislada fueron tratados con la enzima α -1,4-galactosidasa (5 unidades de enzima por mL) durante 2 h con el objeto de hidrolizar el resto polisacárido del receptor de pared, ureasa poligalactosilada, en orden a modificar su actividad como ligando. Se contabilizaron hasta un total de 100 células por tratamiento y se analizaron cuáles estaban marcadas (presentaban fluorescencia verde debido a la unión de la arginasa-ITCF y su receptor de pared).

Cuando las fotobiontes de *Peltigera* fueron incubados con arginasa del mismo líquen y/o de *Evernia*, las células mostraron una intensa fluorescencia verde en el 99-100 % de las muestras analizadas (Tabla III). Sin embargo, el marcaje disminuyó cuando las cianobacterias se trataron previamente con la enzima α -1,4-galactosidasa antes de la adición de la lectina, mostrando una bajada del 79 % y 32 % cuando la arginasa marcada procedía de *Peltigera* o *Evernia* respectivamente.

Tabla III. Resumen del número de células con fluorescencia por la incubación de los fotobiontes de *P. canina* y *E. prunastri* con arginasa segregable marcada con ITCF así como en presencia de α -galactosidasa.

Fotobionte	Número de células marcadas	Número de células NO marcadas
<i>Nostoc</i> + arginasa de <i>Peltigera</i> marcada	100 \pm 9	0
<i>Nostoc</i> + arginasa de <i>Evernia</i> marcada	99 \pm 6	1 \pm 0
<i>Trebouxia</i> + arginasa de <i>Evernia</i> marcada	98 \pm 6	2 \pm 0
<i>Trebouxia</i> + arginasa de <i>Peltigera</i> marcada	99 \pm 6	1 \pm 0
<i>Nostoc</i> + α -galactosidasa + arginasa de <i>Peltigera</i> marcada	79 \pm 6	21 \pm 3
<i>Nostoc</i> + α -galactosidasa + arginasa de <i>Evernia</i> marcada	32 \pm 4	68 \pm 4
<i>Trebouxia</i> + α -galactosidasa + arginasa de <i>Evernia</i> marcada	14 \pm 2	86 \pm 7
<i>Trebouxia</i> + α -galactosidasa + arginasa de <i>Peltigera</i> marcada	18 \pm 3	82 \pm 6

En la figura 50 se muestran las micrografías realizadas por microscopia de fluorescencia para todos los casos analizados. En las células con arginasa fluorescente, se observaron numerosas zonas de intensa fluorescencia verde en las paredes celulares (Figura 50-E/G). En cambio, en el caso de los cianobiontes tratados con la enzima α -galactosidasa y después puestas en contacto con las distintas arginasas marcadas de forma fluorescente, la emisión de fluorescencia verde es menor, lo que permite ver en algunos casos la fluorescencia roja debida a las clorofilas foto-excitadas aunque la acción de la enzima sobre la pared celular no disminuyó significativamente la unión de la arginasa fluorescente a su ligando de pared como quedó reflejado en el conteo de la Tabla III.

Por otro lado, las algas *Trebouxia* incubadas con arginasa del propio líquen y/o de *Peltigera* presentaron una fluorescencia similar a la encontrada para el grupo *Nostoc* (Figura 50-A/C). El tratamiento de las algas con la enzima α -1,4-galactosidasa provocó una inhibición del marcaje del 86 % y 82 % en células incubadas posteriormente con lectina de *Evernia* o *Peltigera* respectivamente. La incubación con α -1,4-galactosidasa dio lugar a unas células con pequeños puntos de fluorescencia verde en las paredes celulares (Figura 50-B/D) mucho menos intensa que en los anteriores casos, permitiendo observar claramente el interior rojo por autofluorescencia de las clorofilas.

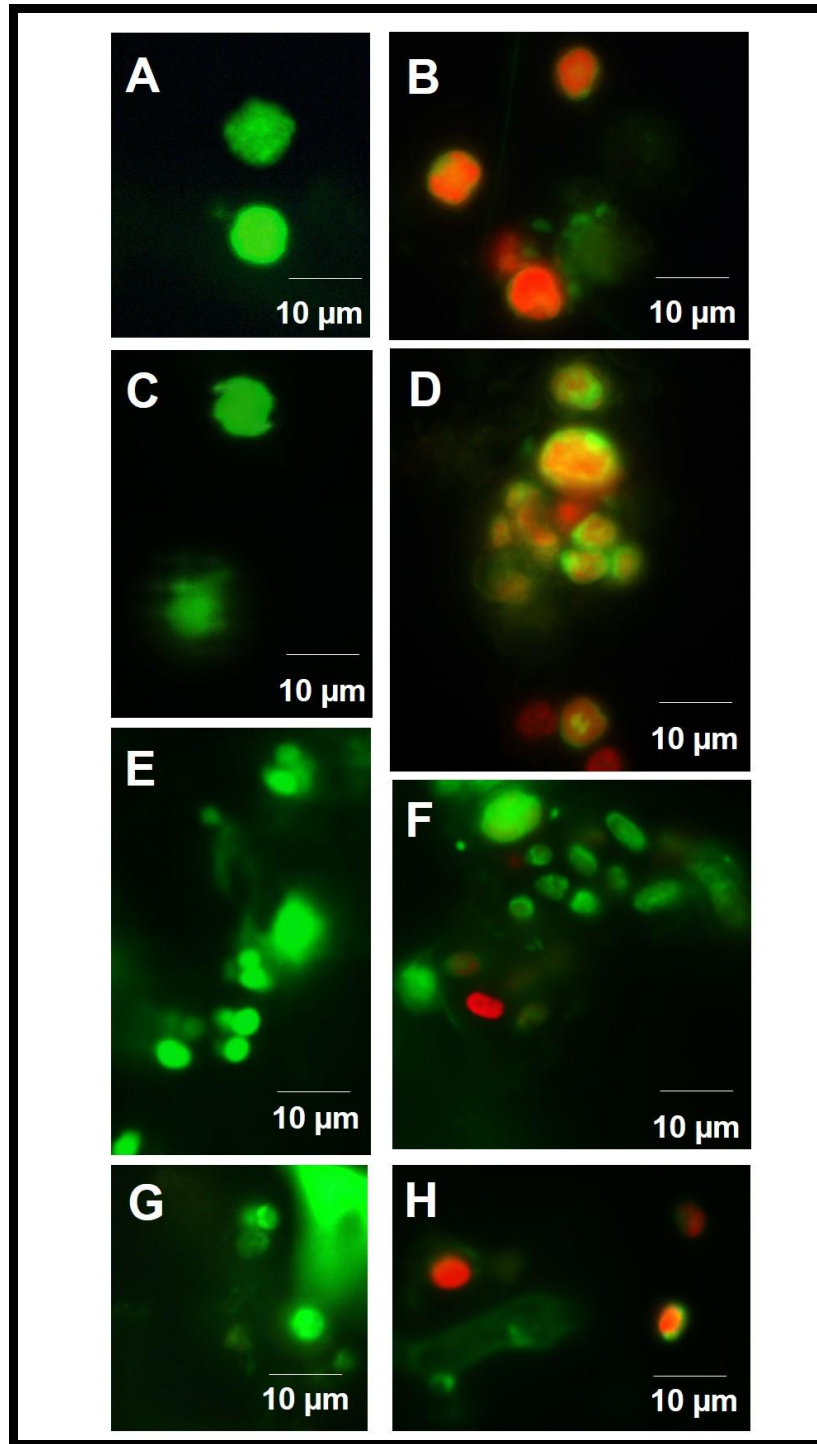


Figura 50. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* (A) incubados con de arginasa de *E. prunastri* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (B) Clorobiontes incubados con α-1,4-galactosidasa (5 u de enzima·mL⁻¹) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *E. prunastri* en las mismas condiciones. Clorobiontes recién aislados de *E. prunastri* (C) incubados con de arginasa de *P. canina* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (D) Clorobiontes incubados con α-1,4-galactosidasa (5 u de enzima·mL⁻¹) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *P. canina* en las mismas condiciones. Cianobiontes recién aislados de *P. canina* (E) incubados con de arginasa de *P. canina* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (F) Células *Nostoc* incubadas con α-1,4-galactosidasa (5 u de enzima·mL⁻¹) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *P. canina* en las mismas condiciones. Fotobiontes de *P. canina* (G) incubados con de arginasa de *E. prunastri* (1 mg·mL⁻¹) y marcada con ITCF durante 2 h en oscuridad bajo el microscopio de fluorescencia. (H) Cianobiontes incubados con α-1,4-galactosidasa (5 u de enzima·mL⁻¹) durante 2 h y a continuación con incubados con arginasa de *E. prunastri* en las mismas condiciones.

Los azúcares obtenidos fueron estimados mediante el método de Dubois y colaboradores (1956) mediante el cual los azúcares reaccionan con ácido sulfúrico en presencia de fenol. La cantidad de azúcares liberados por las enzimas fue mayor para algas de *Evernia*, donde la α -1,4-galactosidasa llevó a cabo una hidrólisis más activa de los polisacáridos de pared de *Trebouxia* que en los cianobiontes de *Peltigera* (Tabla IV).

Tabla IV. μ moles de galactosa por gramo de peso fresco de fotobionte en el sobrenadante, después de incubar las células durante 2 h con α -galactosidasa.

FOTOBIONTE	μ moles DE GALACTOSA/ GPF
<i>Nostoc</i> + α -galactosidasa (469 u/ mL)	0.978
<i>Trebouxia</i> + α -galactosidasa (469 u/ mL)	1.610

6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS DE ARGINASAS DE *PELTIGERA* Y *EVERNIA*

Los medios procedentes de la incubación de *P. canina* y *E. prunastri* durante 2 h en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, con L-arginina 40 mM, se hicieron pasar por lechos de ureasa-agarosa. De la elución de las columnas con tampón Tris-HCl 10 mM a pH 9,15 se obtuvieron fracciones de 2 mL, en las que se cuantificaron la cantidad de proteínas totales y la actividad arginasa. La actividad arginasa recuperada en las fracciones eluidas con tampón conteniendo galactosa (Fracciones 6 a 12) presentó 2 picos de actividad (Fracciones 8 y 10) para la arginasa segregable de *P. canina*, y 3 picos (Fracciones 6, 8 y 10) para la arginasa extraída a partir de talos de *E. prunastri* (Figura 51-B).

La fracción 7 de ambos procesos de separación, así como el medio de incubación del talo de *Peltigera* y *Evernia* en tampón sin pasar por la columna de afinidad, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Figura 51-A) utilizando 5 mg·mL⁻¹ de BSA como control. Las masas moleculares se estimaron utilizando la recta de regresión $y = -0,29x + 2,26$ ($r^2 = 0,92$), obtenida a partir del logaritmo de las masas moleculares de los patrones (Figura 52). En el caso de *Evernia* (calles 3 y 4) se revelaron 2 bandas con una movilidad electroforética de 91,20 kDa y 34,67 kDa respectivamente. En ambos casos se utilizaron 20 μ g de muestra, sin embargo la densidad de bandas fue menor en la calle 4 o fracción 7 de *Evernia* eluida con α -D-galactosa 50 mM. Las bandas obtenidas para la lectina de *Peltigera* fueron 2 con un peso de 72,44 kDa y 33,88 kDa, cuya densidad fue mucho menor en la fracción recuperada con α -D-galactosa.

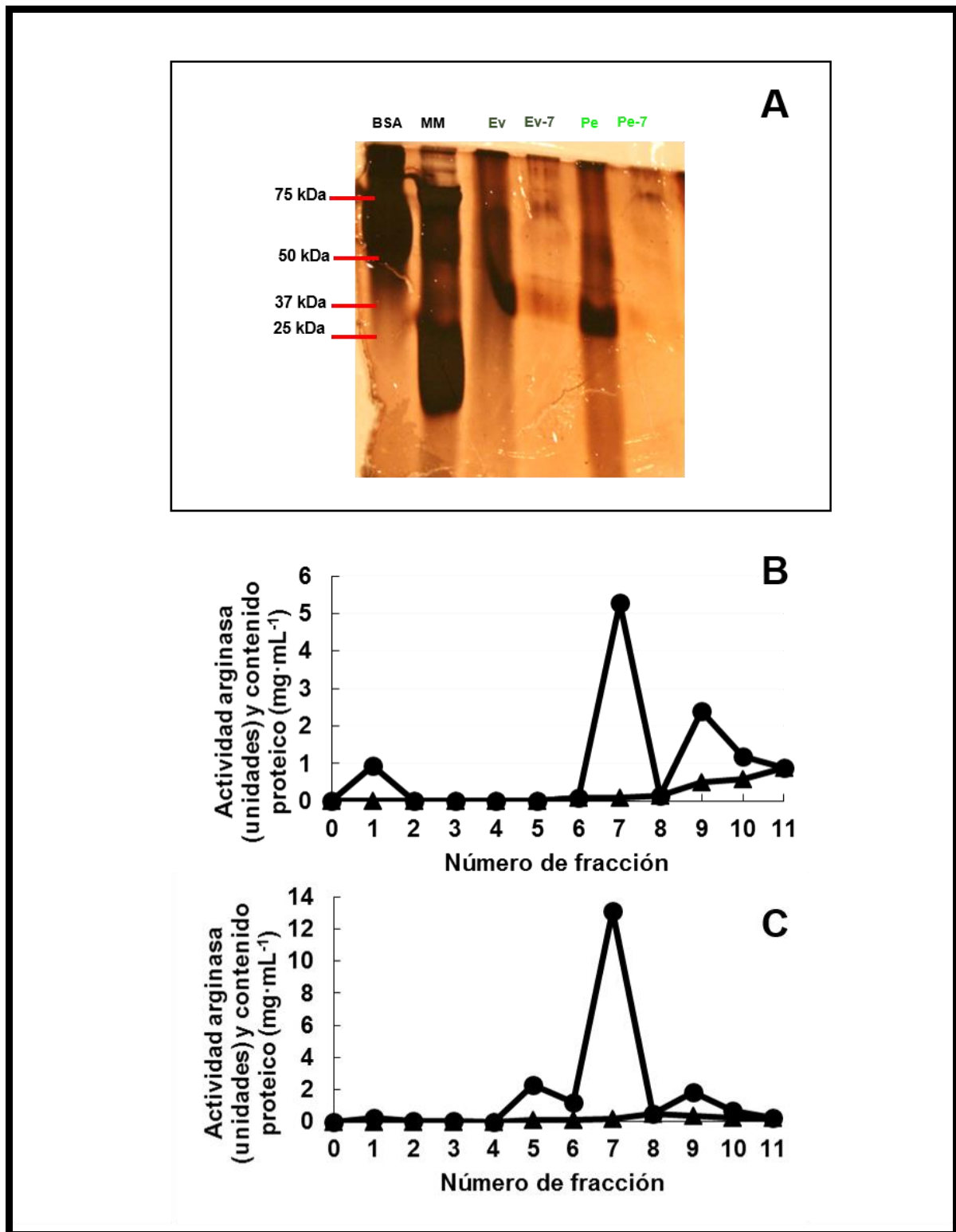


Figura 51. (A) Gel de la electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones de la cromatografía de afinidad. Calle 1: BSA. Calle 2: marcador molecular. Calle 3: Medio de incubación de *Evernia* sin pasar por columna. Calle 4: Fracción 7 de *Evernia* eluida con α -D-galactosa 50 mM. Calle 5: Medio de incubación de *Peltigera* sin pasar por columna. Calle 6: Fracción 7 de *Peltigera* eluida con α -D-galactosa 50 mM. (B) Valoración de la concentración de proteína \blacktriangle y de la actividad arginasa \bullet en las fracciones de elución de la arginasa de *P. canina* y (C) *E. prunastri* sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa de *E. prunastri* adsorbida.

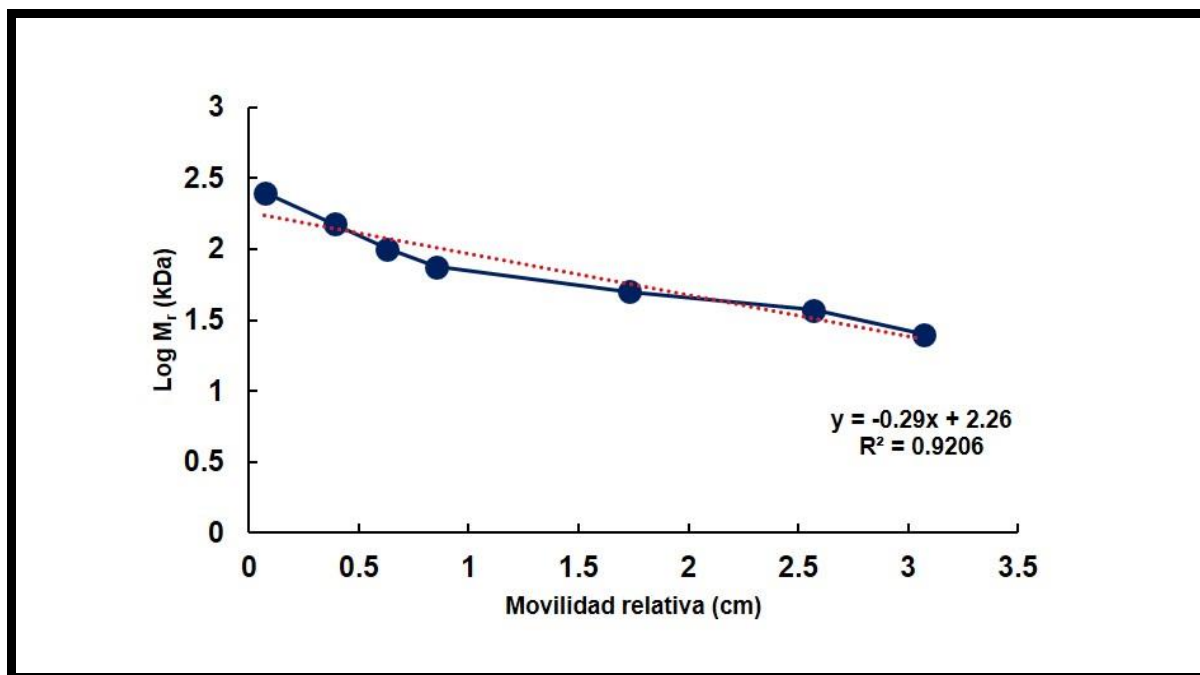


Figura 52. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal.

7. LA PUTRESCINA PROVOCA CAMBIOS EN EL APARATO FOTOSINTETICO DE LOS FOTOBIONTES DE *P. CANINA*

Para determinar los posibles efectos de la putrescina, el producto final de la ruta metabólica iniciada por la arginasa, sobre el aparato fotosintético de los cianobiontes de *P. canina*, un lote de 8 discos de 7 mm de diámetro fueron utilizados. Con el fin de determinar la posición de los cianobiontes en el talo líquénico, se procedió al análisis de sendos cortes transversales sobre especímenes de *P. canina* (Figura 53).

Las fotografías obtenidas mediante microscopio de campo claro mostraron un talo dividido en varias capas. Se observó un córtex superficial, a continuación, de color verde la capa del fotobionte, con hifas laxas mezcladas con cianobacterias, región donde se realiza la fotosíntesis por parte de la cianobacteria y por último la médula con hifas poco apretadas del hongo. La figura 53-B muestra la fluorescencia emitida por las clorofilas presentes en el interior de los fotobiontes.

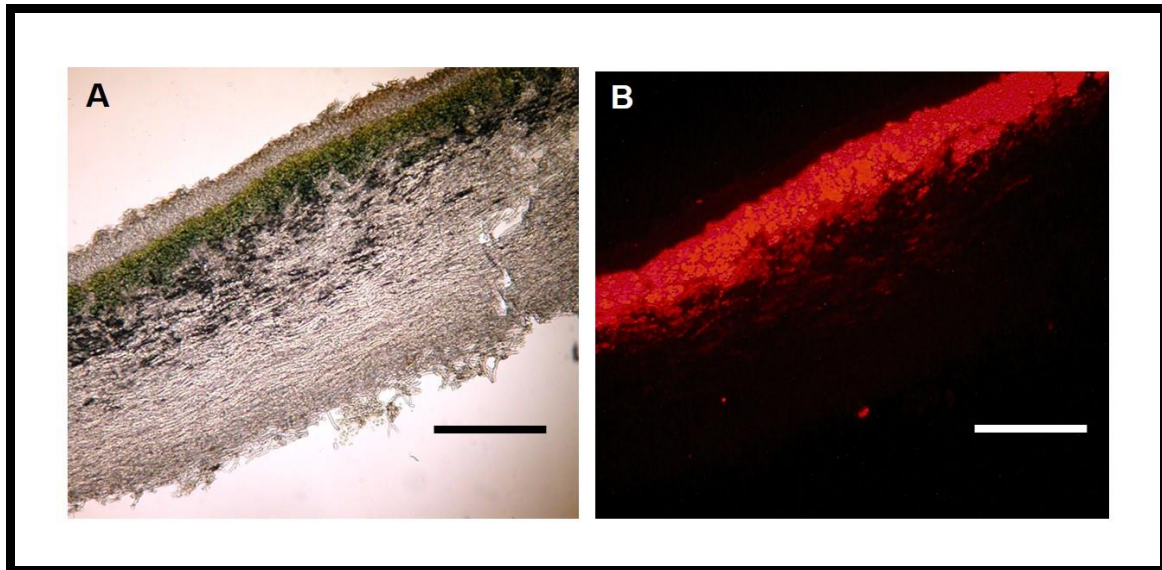


Figura 53. Talo de *P. canina* realizadas mediante microscopía óptica de campo claro y microscopía de fluorescencia. (A) Sección transversal de talo heterómero de *P. canina*. (B) Sección transversal de talo bajo luz azul mostrando la autofluorescencia roja de las clorofilas excitadas de células *Nostoc* sp.

Los cianobiontes incubados con putrescina 2 mM mostraron unos valores de $0,5 \pm 0,02$ para F_v/F_m , superiores al control en todos los tiempos de incubación. Las cianobacterias tratadas con putrescina 10 mM experimentaron un máximo a las 2 h para luego descender hasta alcanzar el valor más bajo de todos los tratamientos a las 8 h (Figura 54).

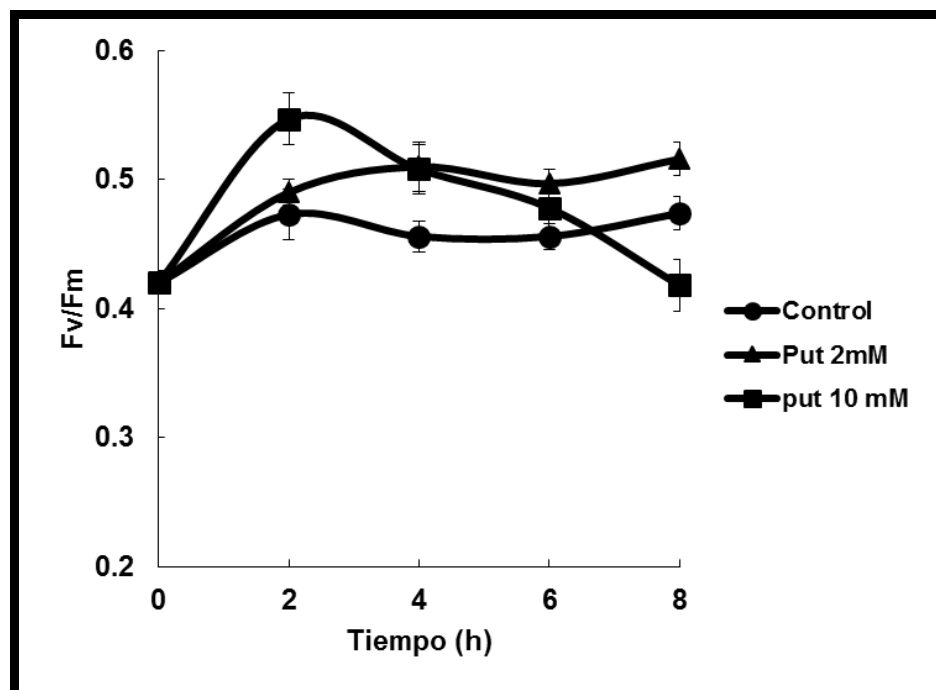


Figura 54. Máxima eficiencia fotoquímica del fotosistema II en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.

La cantidad total de clorofila *a* extraída a partir de talos de *P. canina* se mantiene constante a lo largo del tiempo cuando los talos son incubados en presencia de putrescina 2 mM. En el caso de putrescina 10 mM, la cantidad extraída a las 2 h es de $300 \pm 15 \mu\text{g}$ y va aumentando paulatinamente a lo largo del tiempo de forma paralela al control (Figura 55).

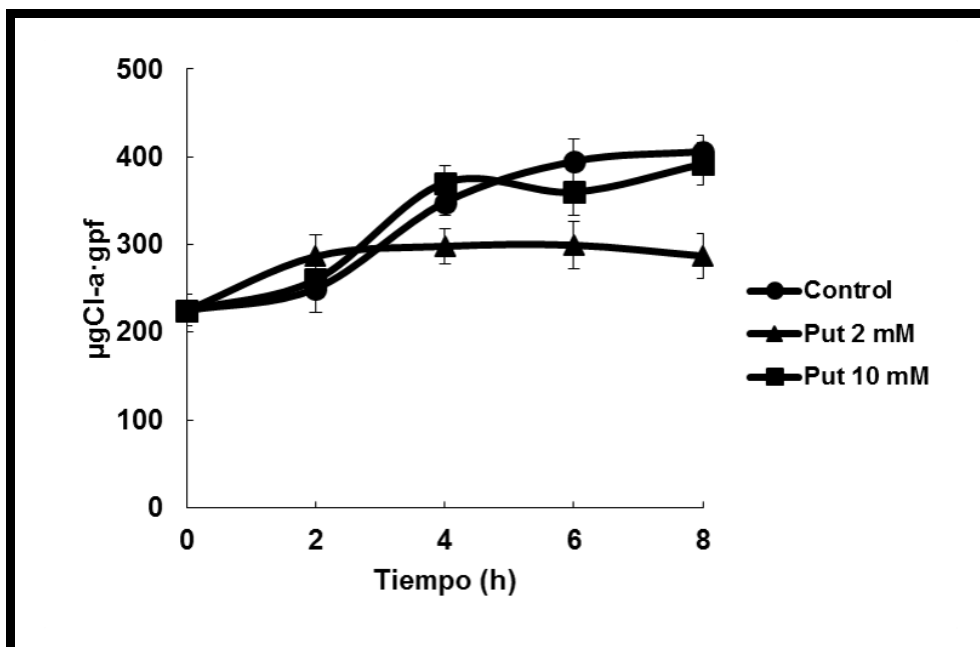


Figura 55. Cantidad de clorofila *a* extraída mediante el método de extracción con DMSO en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.

La relación entre la densidad óptica a 435 y 415, determinó el coeficiente de feofitización, interpretado como la integridad de la clorofila del fotobionte (Roner & Galun, 1984). Los valores de todos los experimentos realizados se encontraron entre 1,2-1,3 independientemente de la hora y tratamiento (Tabla V).

Tabla V. Ratio entre clorofila *a* y feofitinas en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.

	0	2h	4h	6h	8h
Control	1.253±0.005	1.283±0.008	1.332±0.010	1.366±0.005	1.366±0.005
Put 2 mM	1.253±0.005	1.260±0.010	1.228±0.005	1.230±0.005	1.280±0.005
Put 10 mM	1.253±0.005	1.282±0.005	1.230±0.005	1.361±0.050	1.300±0.005

La concentración de MDA se determinó como indicador de preoxidación de lípidos. Las muestras tratadas con putrescina 2 mM mostraron unos valores menores que el control en todas los casos con apenas variación entre tratamientos (Figura 56). Los cianobiontes incubados en putrescina 10 mM presentaron unos valores de peroxidación superiores a los encontrados para putrescina 2 mM a las 2 h de tratamiento, sin embargo, a apartir de dicho tratamiento la cantidad de MDA observada aumenta hasta alcanzar un máximo a las 6 h.

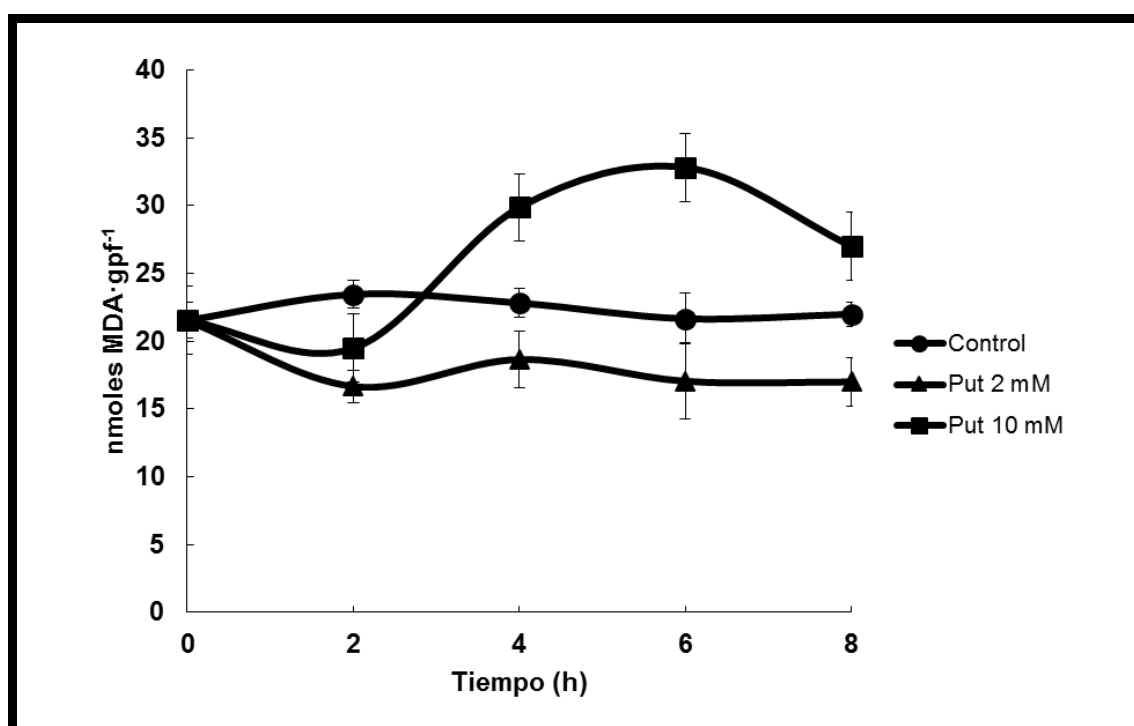


Figura 56. Cantidad de malondialdehído presente en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.

Se valoró el efecto de la putrescina sobre la actividad β -1,4-glucanasa en los fotobiontes de *P. canina* según el método de Summer (1921). Como sustrato de la enzima se utilizó carboximetil celulosa comercial al 0,75 % (p/v) en tampón acetato de sodio, 50 mM, pH 5. Las cianobacterias incubadas en putrescina, tanto 2 como 10 mM, presentaron un aumento de la actividad respecto al control en las 2 primeras horas de tratamiento (Figura 57). Después de las 2 h, los valores bajaron hasta alcanzar un mínimo a las 4 h en ambos casos para continuar aumentando hasta las 8 h de tratamiento. En el caso de las células control la actividad fue de menor a mayor a medida que aumentaba el tiempo de incubación.

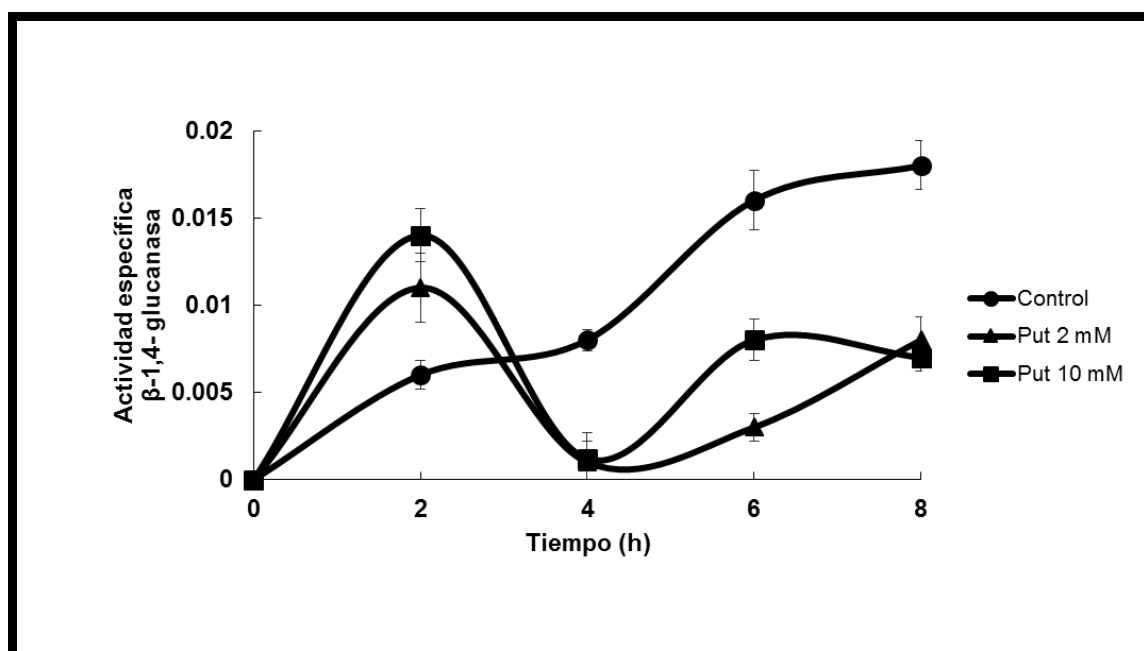


Figura 57. Actividad específica de la enzima β -1,4-glucanasa presente en talos de *P. canina* incubados con putrescina en tampón fosfato potásico durante 2, 4, 6 y 8 h.

8. EFECTO DE QUIMIOTRACCIÓN PRODUCIDO POR LA LECTINA FÚNGICA

8.1. Los cianobiontes de *P. canina* son atraídos hacia a una concentración conocida de arginasa producida por el mismo líquen

Hasta el momento se ha estudiado el mecanismo de reconocimiento-discriminación entre mico y fotobionte en el cianolíquen *P. canina* basándonos en trabajos previos del grupo de investigación realizados con clorolíquenes. En los siguientes apartados se presentan los resultados concernientes al movimiento del cianobionte.

El papel de la quimiotaxis sobre cianobiontes aislados a partir de talos de *P. canina* fue estudiado mediante capilares en los que se introdujeron 20 μ L de lectina a una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se depositaron en placas petri con un inclinación de 45°. Se añadieron 100 μ L de una suspensión de cianobacterias a 4 mm del capilar. A continuación las placas fueron cubiertas para evitar la luz, las corrientes de aire así como para minimizar la evaporación. La totalidad de las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 2, 4, 6 y 8 h. Después de la incubación se recogieron los capilares y fueron secados en la superficie exterior. El contenido de los capilares fue observado bajo el microscopio de campo claro y se contaron 10 campos por capilar en un total de 3 muestras por tratamiento.

Se obtuvo un número máximo de entrada a las 8 h de tratamiento en las cianobacterias incubadas frente a capilares con lectina fúngica (Figura 58), para y disminuir y estabilizarse a partir de las 12 h. El tiempo de máxima entrada en el capilar se utilizó como periodo de incubación para realizar un análisis dosis-respuesta. El número de células contabilizadas en los capilares que contenían tampón de extracción fue menor en todos los tratamientos.

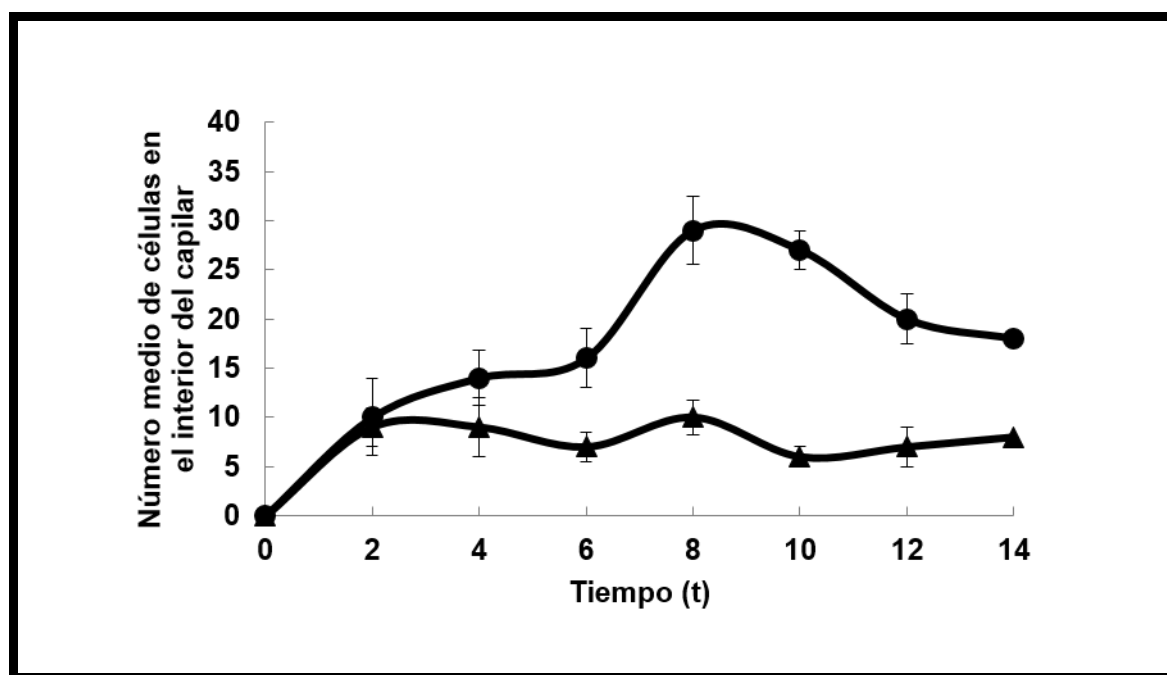


Figura 58. Curso temporal de la movilidad celular de cianobiontes de *P. canina* hacia lectina purificada ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir del mismo líquen ▲ y hacia tampón de extracción como control ●, estimado como el número de células que entran en un capilar a distintos períodos de tiempo. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

La respuesta obtenida mostró un perfil de tipo semi-gausiano, con un pico de máxima actividad a $0,75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de arginasa purificada (Figura 59), coincidiendo con los modelos clásicos de respuesta quimiotáctica controlados por gradientes químicos.

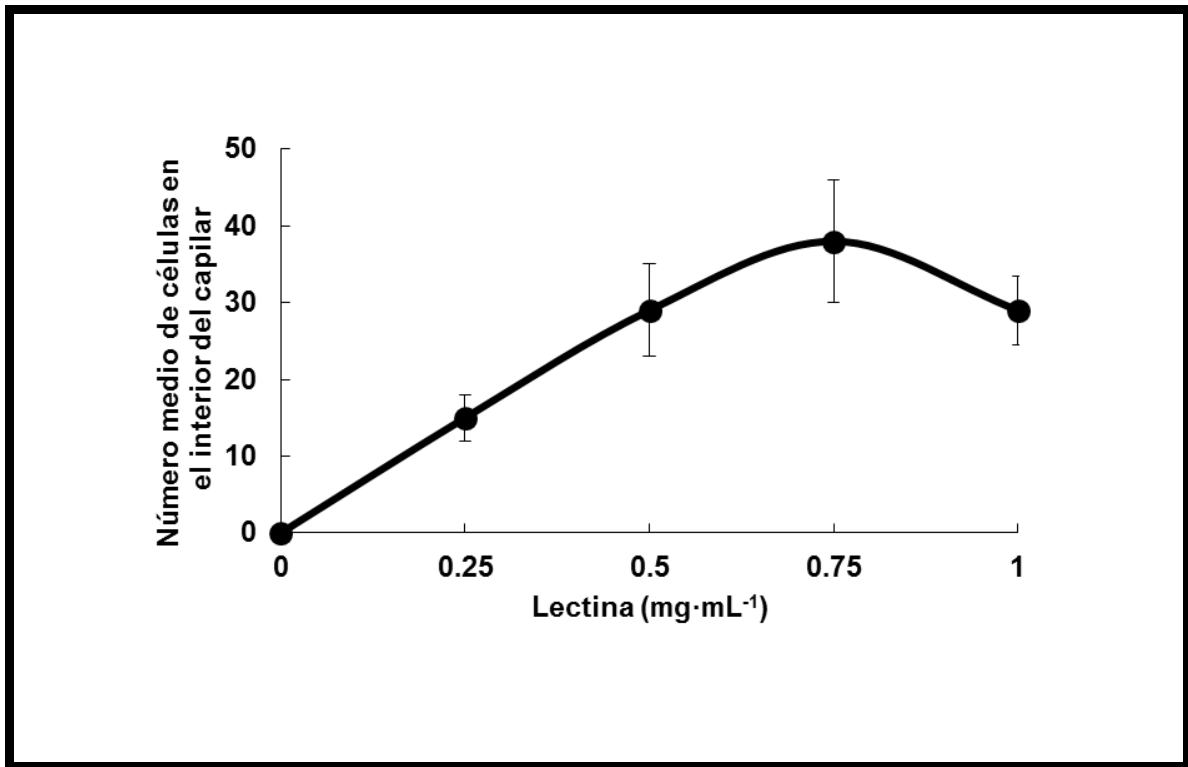


Figura 59. Curva dosis-respuesta de movilidad de *Nostoc* sp. después de 8 h de incubación frente a concentraciones variables de lectina fúngica purificada a partir de *P. canina*. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

El análisis morfológico de las células en el interior del capilar a través del microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara refrigerada Olympus DP72, así como de las cianobacterias que no habían entrado en el capilar, reveló diferencias entre los cianobiontes que sí se habían desplazado y los que no (Figura 60-C/D). Mientras que las células presentes en la placa aparecieron de forma individual o en conjuntos de dos individuos (Figura 60-A/B), en el interior del capilar las cianobacterias estaban asociadas en grupos de hasta 15-20 células en algunos casos, formando filamentos no ramificados (Figura 60).

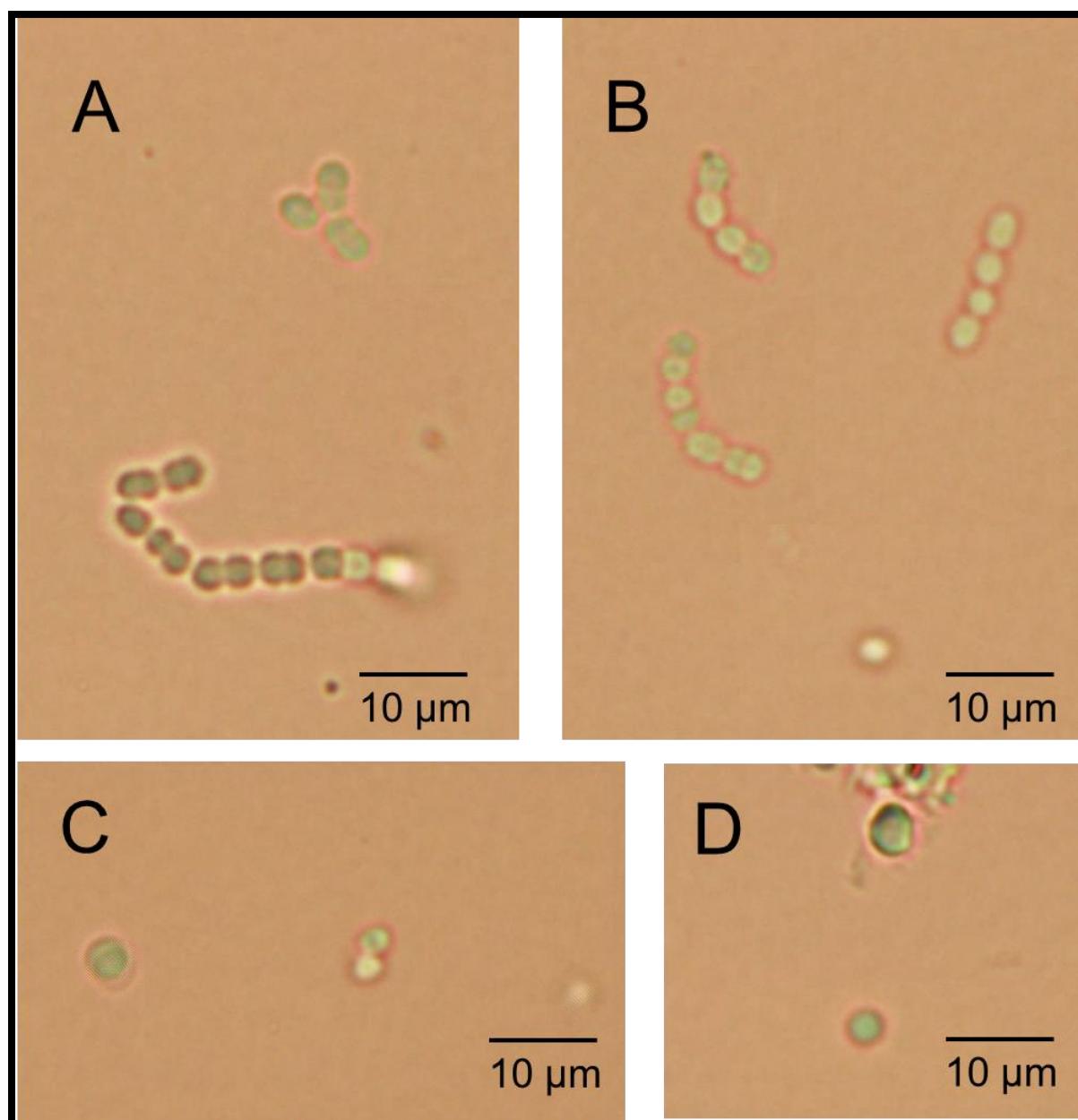


Figura 60. Cianobiontes de *P. canina* (A y B) recogidos del interior de capilares en los que se introdujo 20 µL de lectina fúngica con una concentración de 1 mg·mL⁻¹. Cianobiontes (C y D) que no se han desplazado hacia el capilar, es decir, presentes en la placa Petri.

Para investigar si la quimiotaxis induce una redistribución polarizada del ligando en la superficie de las células *Nostoc* que migran, se utilizó arginasa purificada a partir de *P. canina* y marcada con ITCF, para el ensayo de quimioatracción (Figura 61). Después de 4 h, se encontraron células vegetativas e individualizadas que mostraron emisión intensa y homogénea de la fluorescencia verde de la superficie. Las cianobacterias del interior capilar aparecieron formando filamentos, y de nuevo mostraron una fluorescencia uniforme sobre la superficie de *Nostoc* sp.

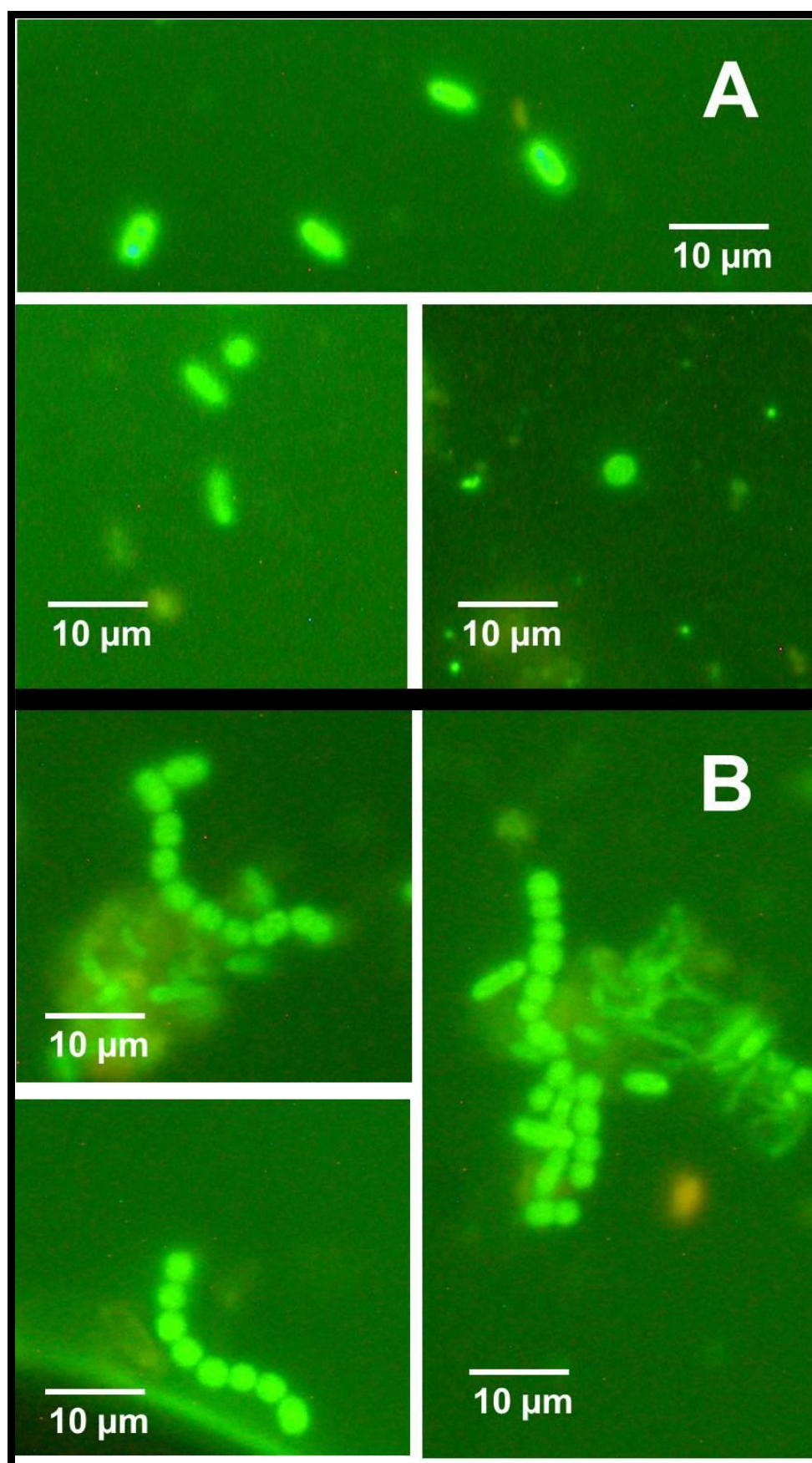


Figura 61. Cianobiontes de *P. canina* (A) que no se han desplazado hacia el capilar, es decir, presentes en la placa Petri. Cianobiontes (B) recogidos del interior de capilares en los que se introdujo 20 µL de lectina fúngica marcada con ITCF con una concentración de 1 mg·mL⁻¹.

8.2. La luz influye en el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica

Se analizó el efecto de la luz sobre el desplazamiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica. Cianobiontes aislados fueron incubados a temperatura ambiente durante 2, 4, 6 y 8 h en una cámara de crecimiento en condiciones de iluminación variable según tratamiento (luz blanca, roja y oscuridad).

Los valores contabilizados fueron superiores en aquellos lotes incubados en presencia de luz blanca (Figura 62). El número de cianobiontes presentes en el interior del capilar fue menor en todos los casos incubados en oscuridad. Los experimentos realizados en presencia de luz roja aumentaron el número de células en todos los tiempos de incubación, llegando a alcanzar un máximo a las 8 h de igual valor que los cianobiontes en presencia de luz blanca.

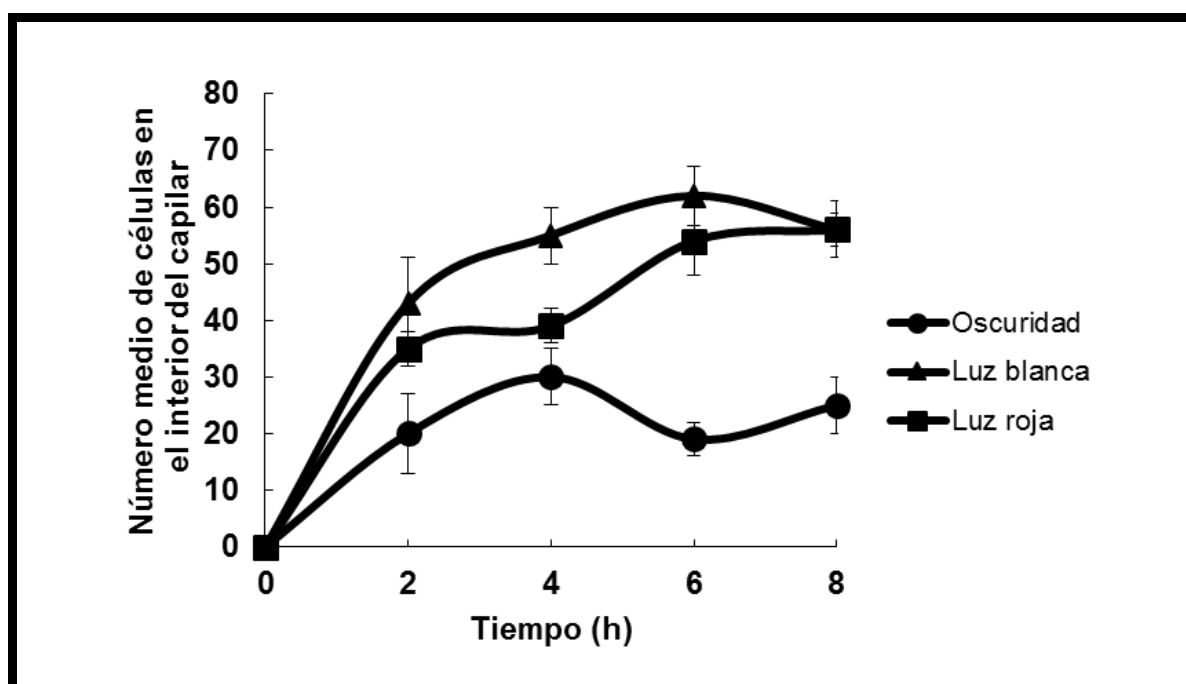


Figura 62. Cianobiontes recogidos del interior de capilares en los que se introdujo 20 μL de lectina fúngica con una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en función del tipo de luz radiada. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

9. LOS CIANOBIONTES NO PRESENTAN ORGANULOS O FIMBRIAS PARA SU DESPLAZAMIENTO

9.1. Microscopía de barrido

Los fotobiontes de *P. canina* fueron analizados mediante microscopía de barrido (SEM). Las células *Nostoc* sp. presentes en la placa, es decir, aquellas que no se han desplazado hacia la lectina fúngica, no presentaron ningún tipo de estructura externa que pudiera relacionarse con la movilidad de los cianobiontes (Figura 63).

En todos los casos observados aparecen de forma individual y en la superficie se apreciaron unas pequeñas espículas. Las cianobacterias presentaron una forma esférica aunque en la mayoría de los casos parcialmente achatada en los polos dándole un aspecto elipsoide (Figura 63-A/B). Esta pérdida de esfericidad permite dividir a la célula en dos mitades a través de un plano transversal. La mitad 1 con una forma convexa y la mitad 2 con una invaginación cóncava cuyo diámetro varía entre las células observadas (Figura 64).

Sin embargo, cuando las células se desplazaron hacia el interior del capilar las espículas de la pared celular no estaban presentes. Aparece una vaina que cubre la totalidad de la superficie celular y en algunos casos se observaron protuberancias, pero eran muy pequeñas y no mostraron las características de fimbrias completamente formadas (Figura 63-C). Cuando los filamentos están formados, las células adquieren una forma cilíndrica y quedan envueltas por una funda mucilaginosa común a todas ellas (Figura 63-D/E).

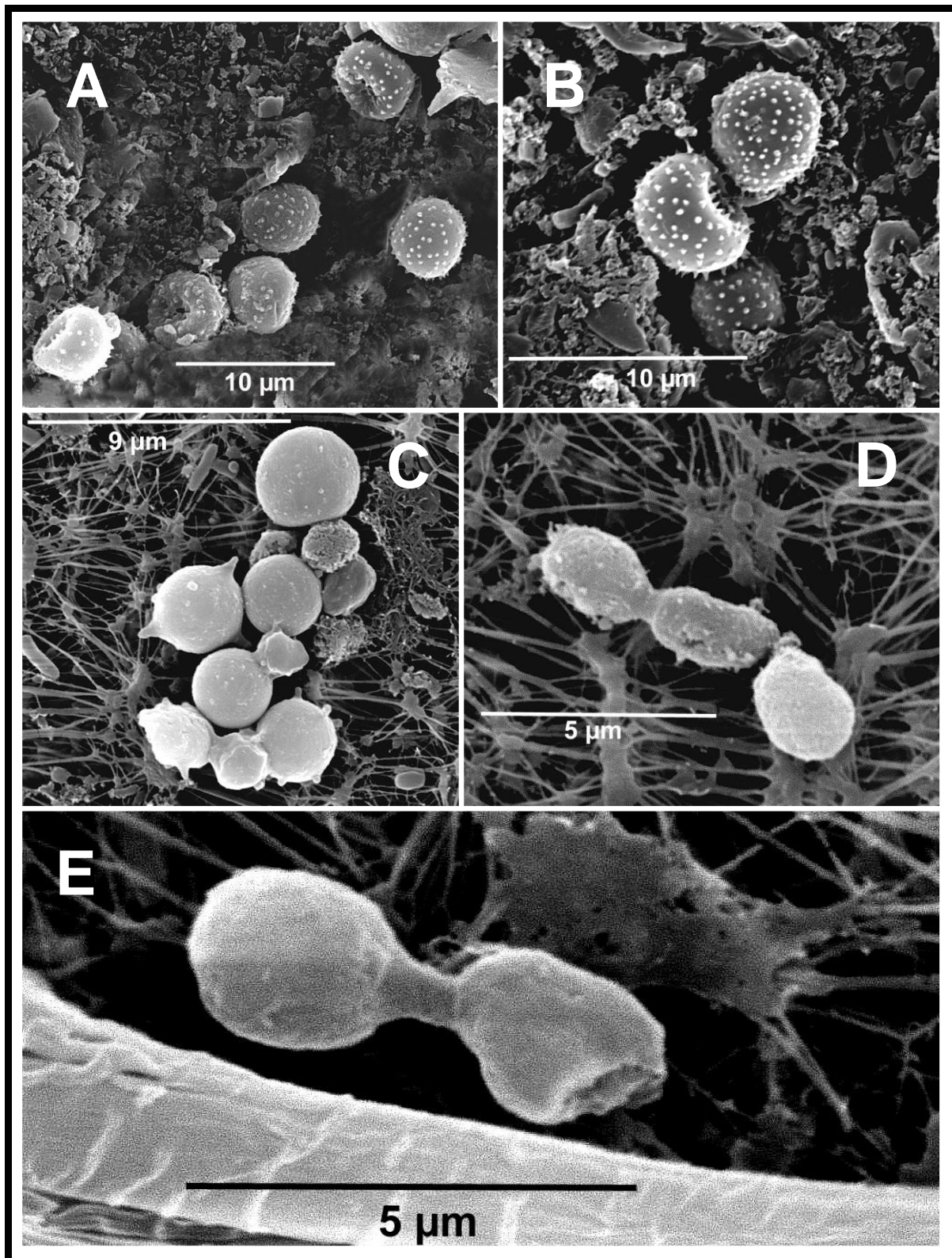


Figura 63. Micrografías de barrido de cianobiontes *Nostoc* de *P. canina* después de 4 h en contacto con un capilar con 20 ng de lectina aislada a partir del mismo líquen e incubadas a 4 mm del capilar en tampón de extracción. (A-B) Células *Nostoc* que no se han desplazado hacia la lectina. Las micrografías revelan una ausencia de orgánulos periféricos en todos los casos, así como la presencia de pequeñas espículas sobre la superficie invaginada. (C-D-E) Cianobiontes presentan en el interior del capilar, agrupados formando filamentos incipientes y cubiertos de una sustancia mucilaginosa.

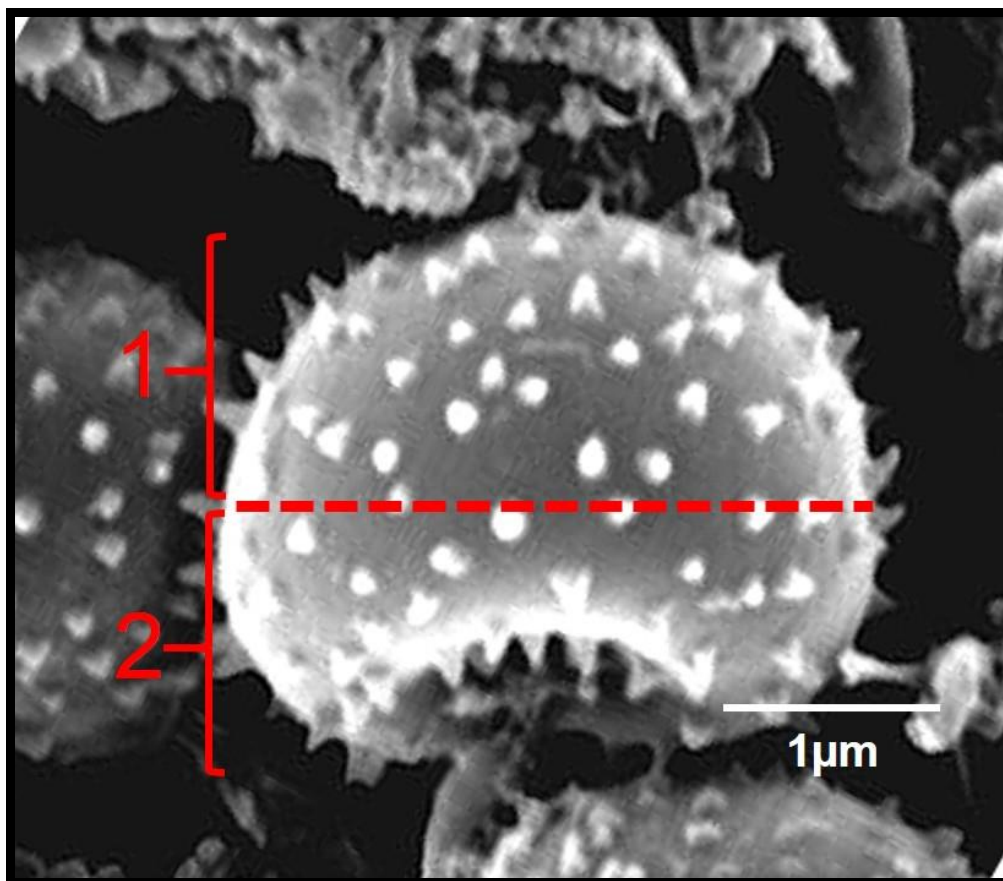


Figura 64. Micrografía de barrido de *Nostoc* después de 4 h en contacto con un capilar con 20 µg de lectina aislada a partir del mismo líquen e incubadas a 4 mm del capilar en tampón de extracción. La figura presenta una de las células no desplazadas al interior del capilar, es una muestra representativa de la forma de los cianobiontes que no se han movilizad hacia la lectina fúngica.

9.2. Microscopía de transmisión

Mediante el análisis de micrografías de transmisión se estudió la pared celular de los cianobiontes de *P. canina*.

De nuevo, las células no mostraron estructuras de movilidad en su superficie (Figura 65). Las micrografías muestran una compleja capa externa, desde el interior al exterior se observó: una capa de peptidoglicanos, membrana plasmática y una capa externa de tipo irregular o serrada. En el interior celular se apreciaron numerosos tilacoides ondulantes, ocupando un gran porcentaje del volumen total de la cianobacteria. En las cercanías de la membrana plasmática se visualizó el citoplasma en el que aparecían pequeños puntos dispersos por toda la célula identificados como ribosomas. Así mismo varios gránulos esféricos y densos fueron descritos como cuerpos proteicos mientras que las áreas más claras posibles zonas de ADN.

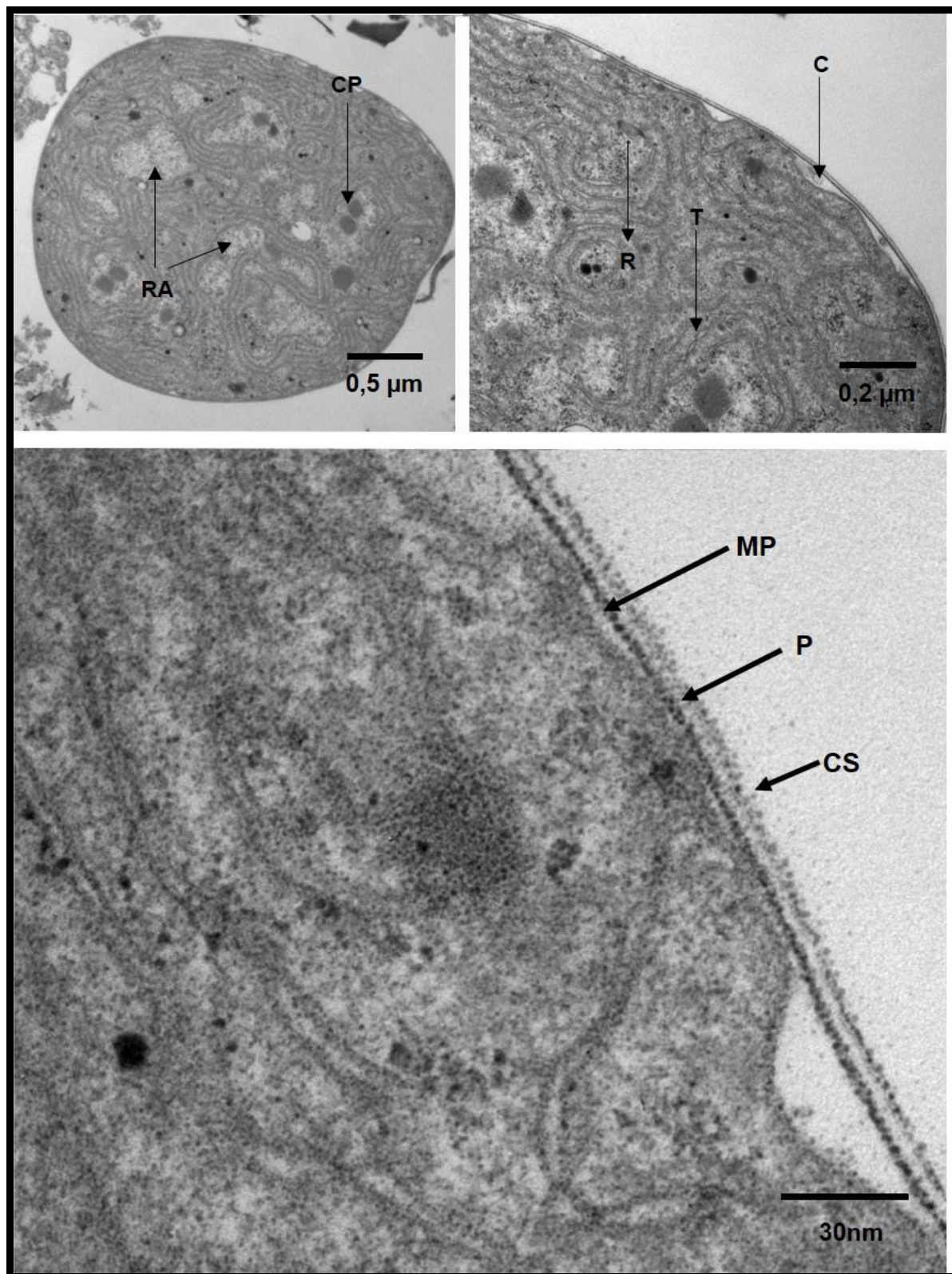


Figura 65. Micrografías de transmisión de cianobiontes aislados de *P. canina* mostrando a diferentes aumentos una compleja capa externa con subestructura serrada (CS), espacio periplasmático y péptidoglicanos (P), membrana plasmática (MP). En el interior celular aparecen: tilacoides (T), regiones de ADN (RA), citoplasma (C), cuerpos proteicos (CP) y ribosomas (R).

10. A-22: INHIBIDOR DE MreB, NO INHIBE LA MOTILIDAD DE LOS CIANOBIOTNES DE *P. CANINA*

Para determinar la posible implicación del citoesqueleto bacteriano en el desplazamiento de cianobiontes de *P. canina* hacia la lectina fúngica, se utilizó A-22. Se usaron capilares en los que se introdujeron 20 μL de lectina a una concentración de $0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se depositaron 100 μL de una suspensión de cianobiontes (60 mg de peso seco $\cdot\text{mL}^{-1}$) en placas petri con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1% PVP 40.000 y 0,25% BSA) en presencia y ausencia de A-22 a una concentración de 20 μM durante un tiempo de incubación entre 2 y 8 h. Posteriormente se contabilizaron las células en el interior del capilar y se analizaron las diferencias numéricas y morfológicas (únicamente a las 4 h de incubación) con respecto a un control en ausencia del inhibidor.

El número de células presentes en el capilar, previamente tratadas con A-22, no se vio alterado en ninguno de los tiempos de tratamiento e incluso fue mayor para el tratamiento a 2 y 4 h de incubación (Figura 66). Idénticos resultados se obtuvieron mediante el uso de una concentración de A-22 cinco veces mayor que la anteriormente utilizada, 100 μM (datos no mostrados).

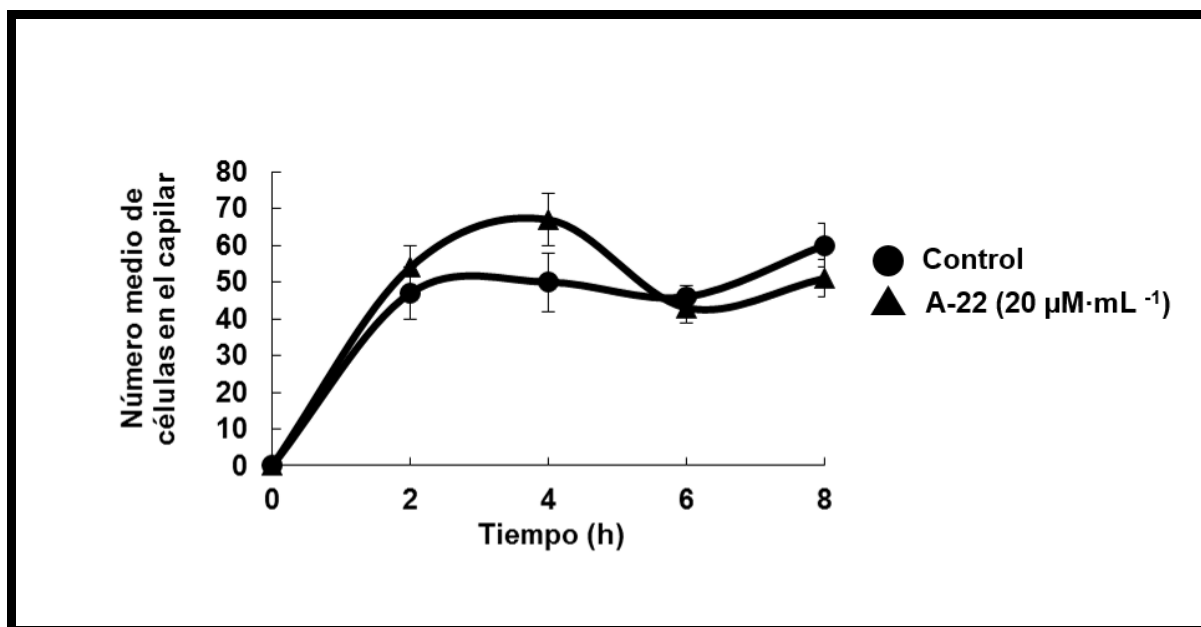


Figura 66. Efecto del inhibidor A-22 en la movilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 μL de lectina fúngica ($0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtenida a partir del mismo líquen. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

Trascurridas 4 h, los cianobiontes recogidos del interior del capilar, tratados con el inhibidor de MreB, presentaron una distribución espacial variable así como una fluorescencia que iba del verde intenso al rojo pasando por el amarillo verdoso (Figura 67). La faloidina unida a un fluorocromo permite determinar la posición de la actina polimerizada en la célula analizada. La utilización de inhibidores específicos que afectan a la formación de estructuras de MreB, favorecen las formas menos complejas. Sin embargo, las células incubadas en presencia de A-22, que alcanzaron el capilar del mismo modo que las células no tratadas, mostraron una fluorescencia asimétrica (Figura 67). Los cianobiontes presentaron zonas con menor intensidad de fluorescencia e incluso ausencia de la misma, lo que permitió ver el color rojo intenso propio de la auto-fluorescencia de las clorofilas.

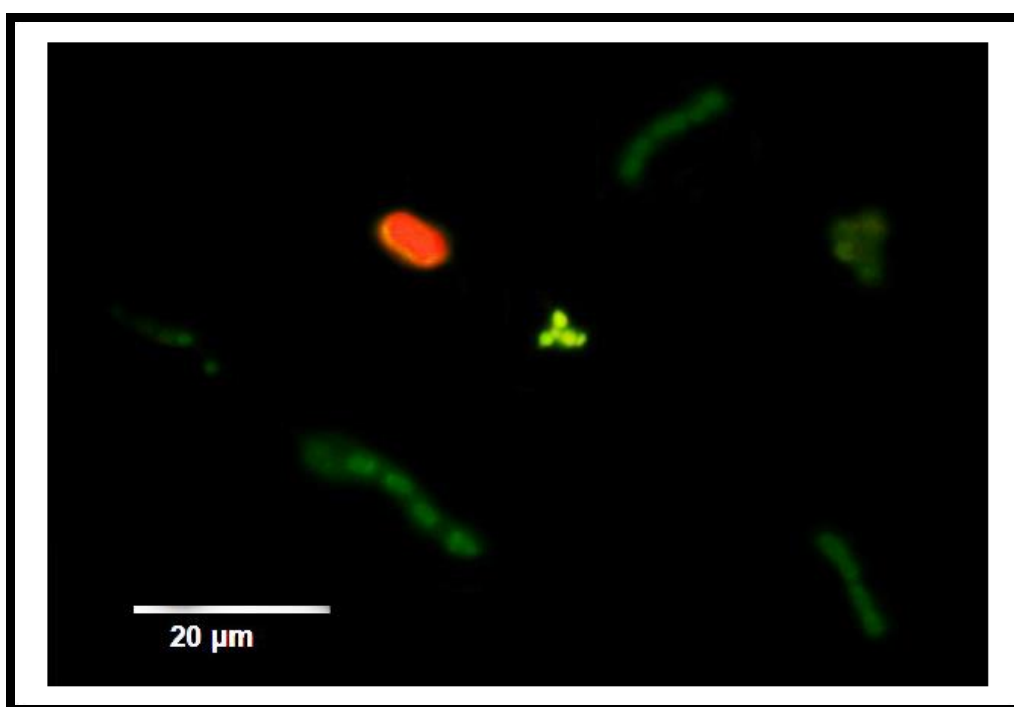


Figura 67. Micrografía de fluorescencia de células *Nostoc* presentes en el interior un capilar conteniendo 20 ng de lectina ($0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en presencia de A-22 $20 \text{ }\mu\text{M}$ y revelados con faloidina-ITCF.

11. LOS INHIBIDORES DE LA ACTINA Y MIOSINA EUCARIOTICAS DISMINUYEN LA MOVILIDAD DE LOS CIANOBIOTES HACIA LA LECTINA FÚNGICA

Se utilizaron capilares en los que se introdujeron $20 \text{ }\mu\text{L}$ de lectina a una concentración de $0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se depositaron $100 \text{ }\mu\text{L}$ de una solución de cianobiontes (60 mg de peso seco $\cdot\text{mL}^{-1}$) en placas petri con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM , pH 7, sorbitol $0,25\text{M}$, 1% PVP 40.000 y 0,25% BSA) en presencia y ausencia de inhibidores del movimiento durante un tiempo de incubación entre 2 y 8 h. Como inhibidores de la actividad

del citoesqueleto se utilizó la blebistatina: una molécula con una alta afinidad y selectividad hacia miosina II y permeable a las membranas celulares.

Concentraciones de 10 μM y 25 μM de blebistatina inhibieron la entrada en el capilar en todos los casos analizados menos a 2 h de tratamiento con blebistatina 10 μM , donde el número de células coincidió con el control (Figura 68-A). El máximo de inhibición fue del 60 % y se encontró cuando las cianobacterias fueron incubadas 4h con blebistatina 25 μM . El tratamiento con faloidina pareció seguir la misma tendencia. La faloidina es capaz de unirse a los filamentos de F-actina con alta afinidad, impidiendo su despolimerización. Cuando los cianobiontes de *P. canina* fueron incubados con diferentes concentraciones de faloidina tales como 0,2 y 0,1 μM , la quimiotaxis se vio inhibida en ambos casos (Figura 68-B). De nuevo el número mínimo de células fue 25 y se alcanzó a las 4 h de incubación con la faloidina más concentrada (0,2 μM) y posteriormente aumentó hasta 34 a las 6 h para luego disminuir nuevamente a las 8 h de tratamiento hasta alcanzar el 50 % de inhibición que aparecía a las 4 h.

Cuando la faloidina 0,2 μM fue combinada con blebistatina 25 μM , la inhibición fue más acusada, superando el 75 % con respecto al control en todos los tratamientos (Figura 68-C). El mínimo número de células en el interior del capilar fue 9 y apareció cuando las cianobacterias fueron incubadas durante 2 h.

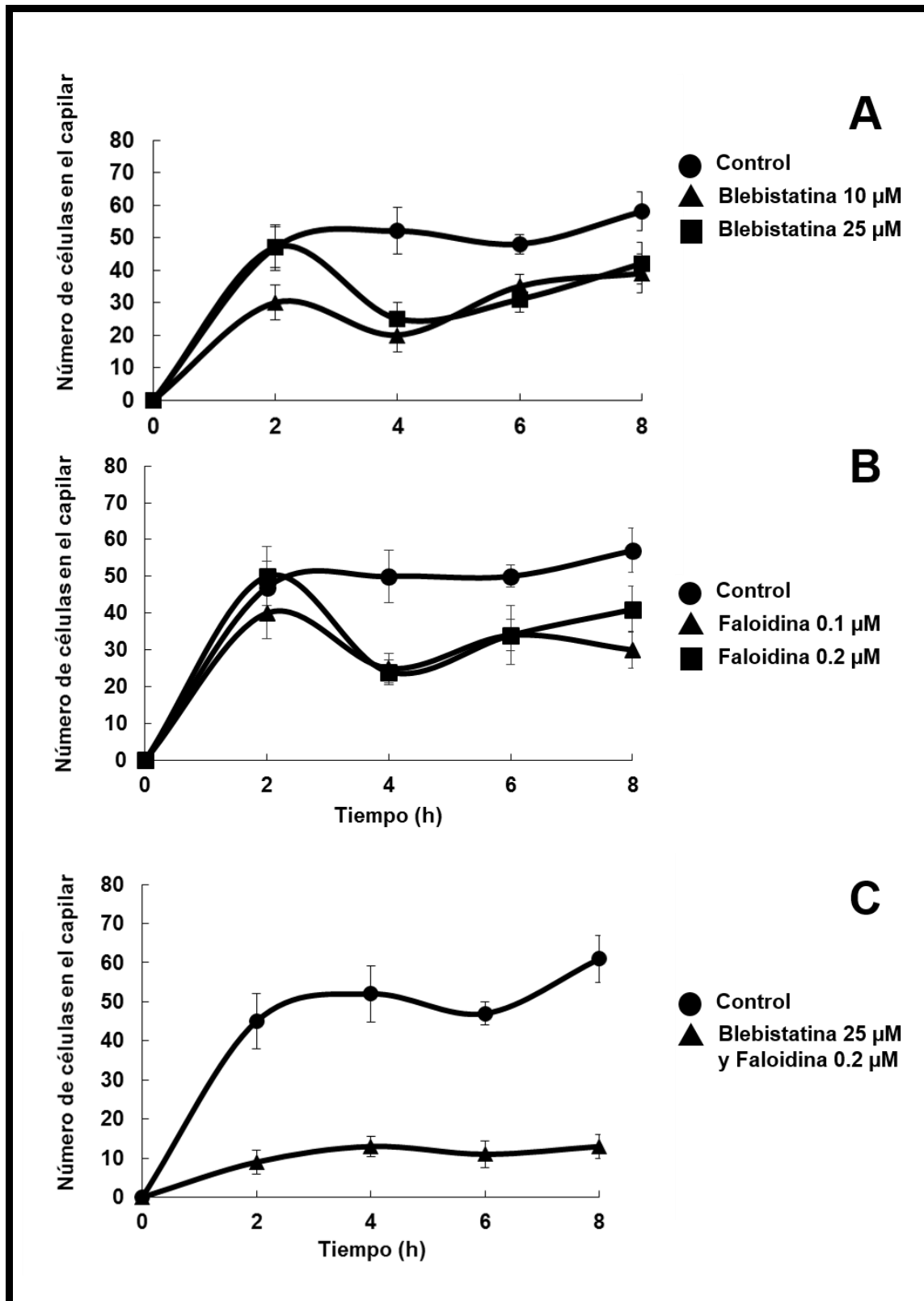


Figura 68. Efecto de inhibidores del citoesqueleto sobre la movilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina fúngica obtenida a partir del mismo líquen. (A) Efecto de la blebistatina sobre la motilidad celular a distintas concentraciones (10 y 25 μM) en términos de número de células *Nostoc* en el interior del capilar, conteniendo la lectina en su interior. (B) Efecto de la faloidina sobre la motilidad celular distintas concentraciones, en términos de número de células *Nostoc* en el interior del capilar, conteniendo la lectina en su interior. (C) Efecto conjunto de la blebistatina (25 μM) de la faloidina (0,2 μM). (D) El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

La latrunculina-A, afecta a la polimerización de la actina formando consistentes complejos en una relación 1:1 entre latrunculina-A y G-actina (Spector *et al.*, 1989). Cuando las cianobacterias fueron incubadas latrunculina-A 10 μ M, la movilidad celular se vio reducida en todos los casos, como se observa en la figura 69. De nuevo apareció un patrón de inhibición del movimiento (descenso-aumento-descenso-descenso), del mismo modo que ocurrió en los tratamientos con faloidina o blebistatina. El máximo de inhibición fue del 76 % con respecto al control y apareció a las 4 h de incubación para luego disminuir en los siguientes tratamientos.

La combinación de latrunculina-A con blebistatina no aumenta la inhibición a lo largo del tiempo, de hecho, el efecto de latrunculina-A y blebistatina en la inhibición del desplazamiento, es opuesto al encontrado al de la blebistatina y faloidina. La combinación de ambos compuestos produjo un efecto muy acusado durante las primeras horas de tratamiento llegando a contabilizar hasta un 83 % menos de células en el capilar en relación al control. Sin embargo, a partir de este período de tiempo, el número de cianobacterias aumentó de forma significativa hasta alcanzar un 17 % de inhibición a las 8 h de incubación.

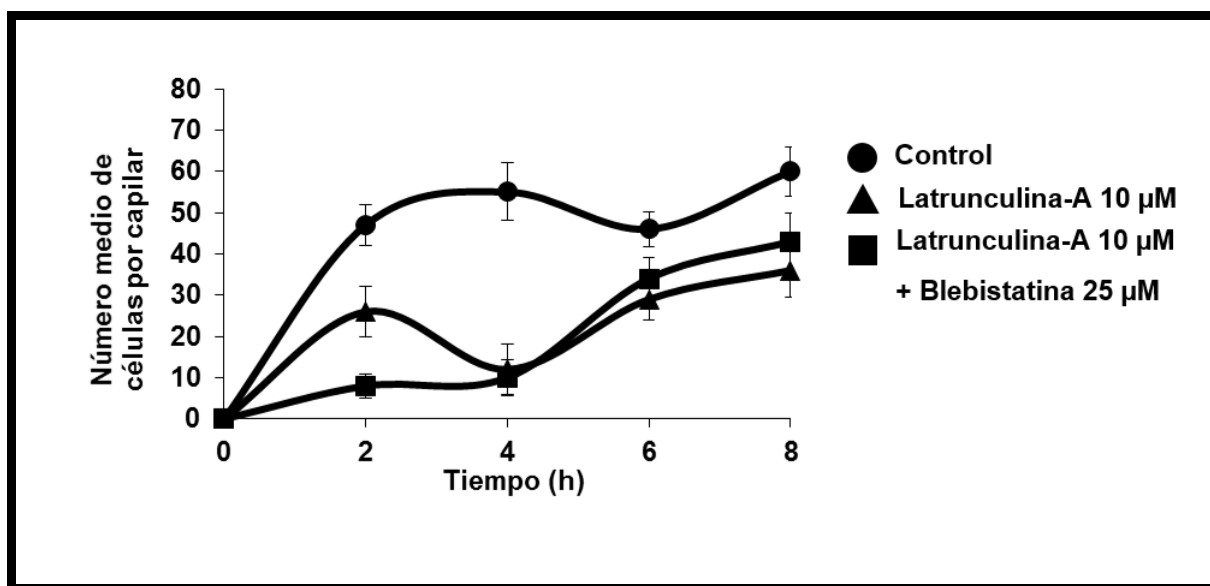


Figura 69. Efecto de Latrunculina-A 10 μ M en la motilidad de los cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina fúngica obtenida a partir del mismo líquen ●. Efecto conjunto de latrunculina-A 10 μ M ▲ y blebistatina 25 μ M ■. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

12. LA TINCIÓN CON FALOIDINA-ITCF NO ES IGUAL EN TODA LA SUPERFICIE DE LAS CIANOBACTERIAS

12.1. Microscopía de fluorescencia

Cianobiontes de *P. canina* fueron atraídos hacia un capilar, conteniendo 20 mg de lectina ($0,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) purificada a partir del mismo liquen. Las células fueron incubadas en placas petri con tampón de extracción (NaOH-Hepes 50 mM, pH 7, sorbitol 0,25 M, 1 % PVP 40.000 y 0,25 % BSA) conteniendo blebistatina 25 μM , blebistatina 25 μM y faloidina 0,2 μM durante 4 h. Después de la incubación se recogieron las células que habían entrado en los capilares. El contenido de los mismos, fue teñido con faloidina-ITCF y observado bajo el microscopio de fluorescencia.

Cuando se visualizaron las células presentes dentro del capilar, apareció una intensa fluorescencia verde por toda la superficie e interior celular, así como cianobiontes formando filamentos de diferente longitud, aunque en ningún caso se ha detectado la presencia de hormogonios ni heterocistes (Figura 70).

En el momento que se añadió blebistatina al tampón, la movilidad quedó restringida y el número de filamentos fue menor con respecto al control, sin embargo la fluorescencia emitida fue idéntica a la observada en ausencia del inhibidor (figura 70-B). La combinación de blebistatina y faloidina dio lugar a la aparición de células individuales (Figura 70-C). En todos los tratamientos realizados se observaron células individuales pequeñas con una zona que no emitieron fluorescencia, pudiendo indicar procesos de despolimerización de la F-actina puesto que la faloidina únicamente se une a la actina polimerizada.

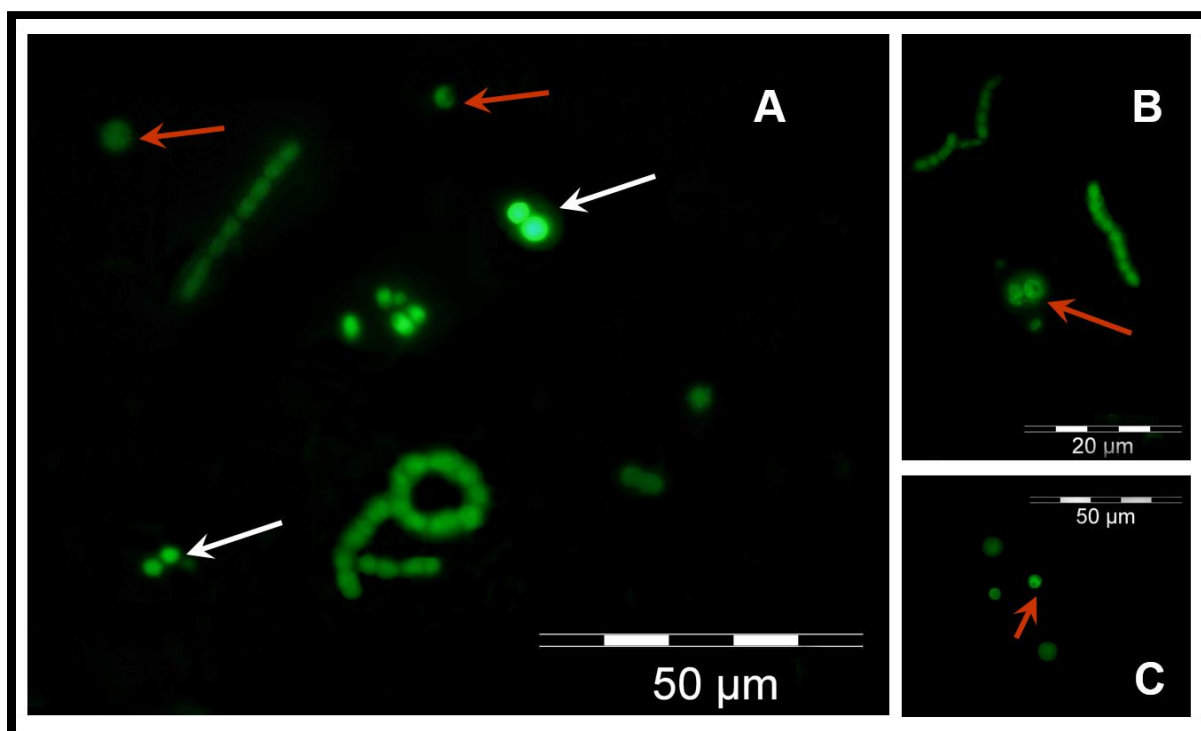


Figura 70. Micrografías de fluorescencia de células *Nostoc* presentes en el interior un capilar conteniendo 20 ng de lectina incubadas en ausencia de inhibidores y (A) posteriormente marcadas con faloidina-ITCF. (B) Cianobiontes incubados en presencia de blebistatina 25 μM , (C) faloidina 0,19 μM y blebistatina 25 μM . Las fechas blancas indican el inicio de la agregación celular. Las fechas rojas indican puntos de probable despolimerización de F-actina, por una ausencia de fluorescencia detectada en esa zona.

Se analizó de forma individual la presencia o ausencia de fluorescencia asimétricamente distribuida en todos los tratamientos (Tabla VI). El 33 % de total de células incubadas en presencia únicamente de la lectina fúngica presentaron tinción asimétrica, zonas con menor intensidad de fluorescencia e incluso no coloreadas en el interior celular. Las células tratadas con el inhibidor blebistatina a una concentración de 25 μM mostraron un número menor de células asimétricas llegando a disminuir hasta la mitad con respecto al número de células observadas en el tratamiento control. Así mismo, el tratamiento combinado de inhibidores tales como blebistatina 25 μM y faloidina 0,19 μM disminuyó aún más el número de células con tinción asimétrica.

Tabla VI. Resumen del número de células con fluorescencia asimétricamente distribuida respecto al número total de células en el interior de un capilar, conteniendo 20 ng de lectina. Las células fueron incubadas en ausencia de inhibidores, con blebistatina 25 μM y/o con faloidina 0,19 μM y blebistatina 25 μM y posteriormente marcadas con faloidina-ITCF.

Tratamiento	Número de células	Número de células con fluorescencia asimétricamente distribuida	%
Control	257 \pm 19	85 \pm 17	33.5
Ble 25 μM	274 \pm 22	48 \pm 5	15.5
Ble 25 μM + Fal 0.19 μM	265 \pm 17	24 \pm 3	9.05

12.2. Cuantificación de la fluorescencia

Cianobiontes de *P. canina* fueron atraídos hacia un capilar conteniendo 20 mg de lectina fúngica (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las células fueron incubadas con blebistatina 25 μM , blebistatina 25 μM y faloidina 0,2 μM combinadas, latrunculina-A 10 μM y A-22 20 μM durante 4 h. Posteriormente se recogió el contenido de los capilares y fueron teñidos con faloidina-ITFC. Se analizaron 15 células por tratamiento y se obtuvieron secciones ópticas de 0,2 μm de grosor hasta un total de 50 y se generaron imágenes de proyección 3-D de tipo extended focus (Figura 71). El microscopio confocal utilizado fue un Leica TCS con un objetivo 63 x.

Las muestras fueron excitadas con una luz de 468 nm de longitud de onda, como máximo de excitación para el fluoróforo. La fluorescencia emitida fue medida a 512 nm. La intensidad de la fluorescencia se calculó sobre la superficie que ocupa cada célula y se definió como una región ROI (region of interest). Para expresar la intensidad de fluorescencia se utilizó el parámetro intensidad de fluorescencia máxima (FMA), mínima (FMI) y media (FME) emitida por pixel. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 72.

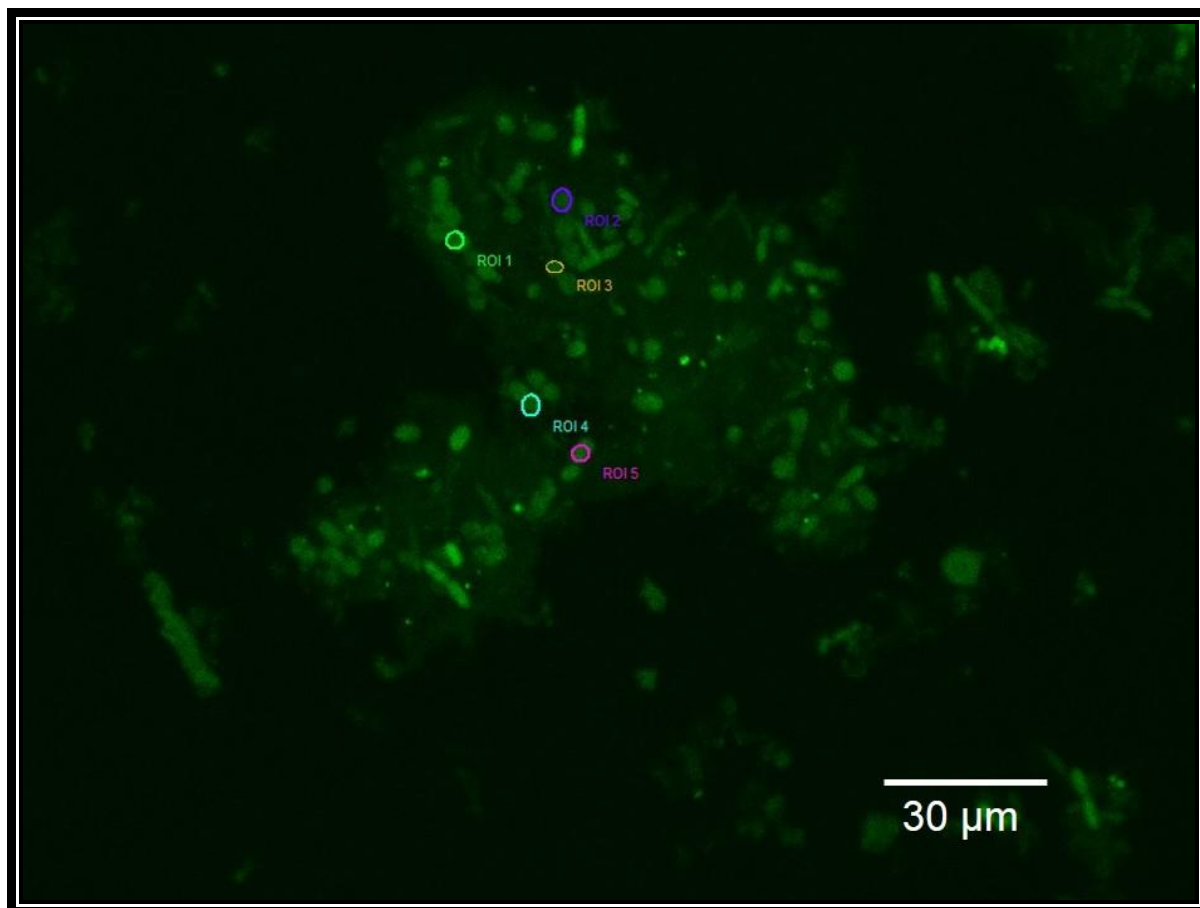


Figura 71. Micrografía confocal de cianobacterias recogidas de un capilar conteniendo 20 mg de lectina ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y posteriormente marcadas con faloidina-ITCF. Las cinco zonas seleccionadas son las denominadas ROI (region of interest) utilizadas para la cuantificación de la fluorescencia.

El tratamiento con faloidina $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ mostró unos valores de FME idénticos al control aunque los valores de FMA y FMI incrementaron en ambos casos. El tratamiento combinado de faloidina $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ y blebistatina $25 \text{ }\mu\text{M}$ supuso una bajada de la fluorescencia en todos los parámetros analizados del mismo modo que la incubación con blebistatina $25 \text{ }\mu\text{M}$ únicamente, no obstante en este caso, FME resultó igual al encontrado en el control.

De todos los tratamientos analizados las cianobacterias incubadas con A-22 $20 \text{ }\mu\text{M}$ mostraron el menor valor tanto mínimo, máximo como medio de fluorescencia de todos los casos analizados con respecto a las células control.

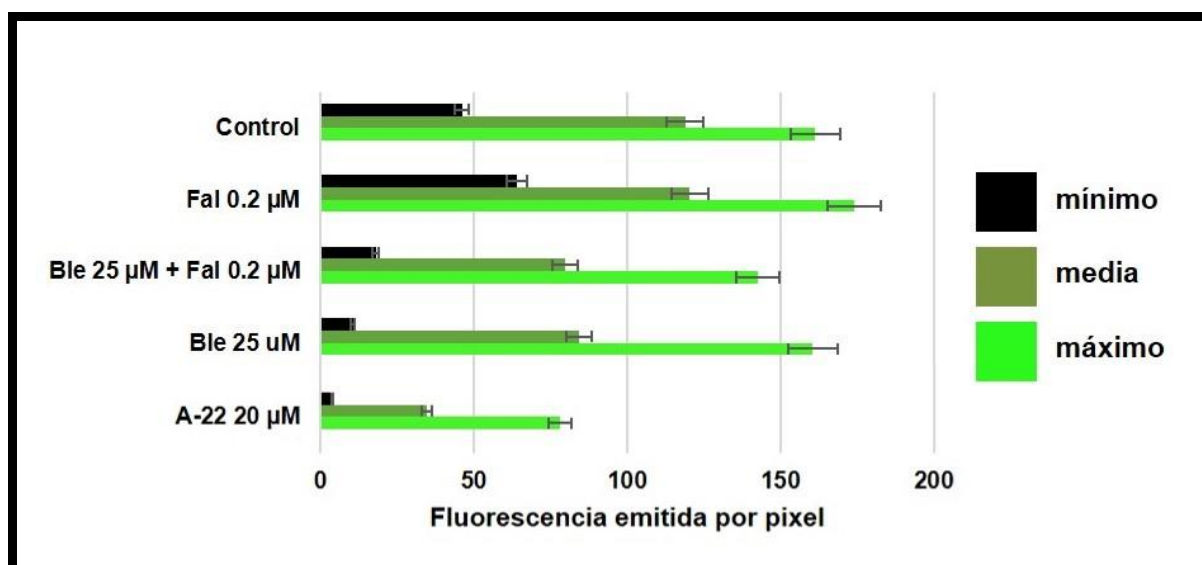


Figura 72. Medida de la intensidad de fluorescencia máxima, mínima y media emitida por pixel en cianobacterias de *P.canina* incubadas durante 4 h con distintos inhibidores según tratamiento.

13. ANTICUERPOS DE ACTINA SE UNEN A EPITOPOS ESPECÍFICOS EN CIANOBIONTES DE *P. CANINA*

13.1. Concentración de proteínas totales en los cianobiontes

Cianobacterias recién aisladas (20 mg), fueron sometidas a una lisis para obtener el contenido proteico de las mismas. Para ello se utilizaron 100 µL de tampón de lisis que contenía: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 1 % (v/v), cóctel inhibidor de proteasas (complete TM, Roche) al 1x1.000 (v/v) y DDT 0,2 M. Se determinó la concentración de proteínas presentes en la muestras con un kit BIO-Rad-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro ULTROSPEC 2000. El contenido proteico total fue 2,5 µg·µL⁻¹.

13.2. Estudio de la actina o proteínas similares por electroforesis

Las proteínas obtenidas a partir de cianobacterias de *P. canina* se separaron en un gel de poliácridamida al 10 % de SDS. Se utilizaron 40, 20, y 10 µg de proteínas, 10 µg de células embrionarias de fibroblastos de ratón de 10,5 días (CEF) como control positivo y una mezcla de proteínas (10-250 kD) Precisión plus, protein kaleidoscope Standards cat 161-0375, para determinar el peso molecular.

Para la localización de la actina se utilizaron los siguientes monoclonal cada uno de los cuales reconoce uno o varios epítomos específicos de la actina:

- Anti-pan-actina de conejo (Sigma A2066), anticuerpo policlonal.
- Anti- β -actina de ratón (Sigma A5441), anticuerpo monoclonal.
- Anti- β -actina de ratón (Sigma A2228), anticuerpo monoclonal.
- Anti- α -actina de ratón (Abcam, ab 40863), anticuerpo policlonal.
- Anti- α -actina de ratón (Sigma A5228), anticuerpo policlonal.

Todos ellos diluidos en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrased Imaging system) en proporción 1:1.

De todos los anticuerpos utilizados, dieron respuesta únicamente dos:

- El anticuerpo anti- α -actina de ratón (Abcam, ab 40863), que puede unirse a la α -actina presente en actina de músculo liso esquelético, vascular y cardíaca en preparados en diluciones bajas de pollo y mamíferos.
- El anticuerpo anti- β -actina de ratón (Sigma A2228), que reconoce un epítipo localizado en el extremo N-terminal de las isoformas β -actina y se utiliza para proteínas de humanos, vacas, cerdos, ovejas, conejos, gatos, perros, ratones, ratas, sanguijuelas, y tejidos de *Drosophila* entre otros.

Se reveló una banda con una masa molecular en torno a 50 kDa y en ambos casos la intensidad de la banda fue en aumento cuanto mayor es la concentración de proteínas utilizadas aumenta. La fracción perteneciente al control (CEF) reveló una banda con una movilidad electroforética ligeramente mayor que la presente en las proteínas de cianobiontes de *P. canina*, con una masa molecular entre 40- 42 kDa (Figura 73).

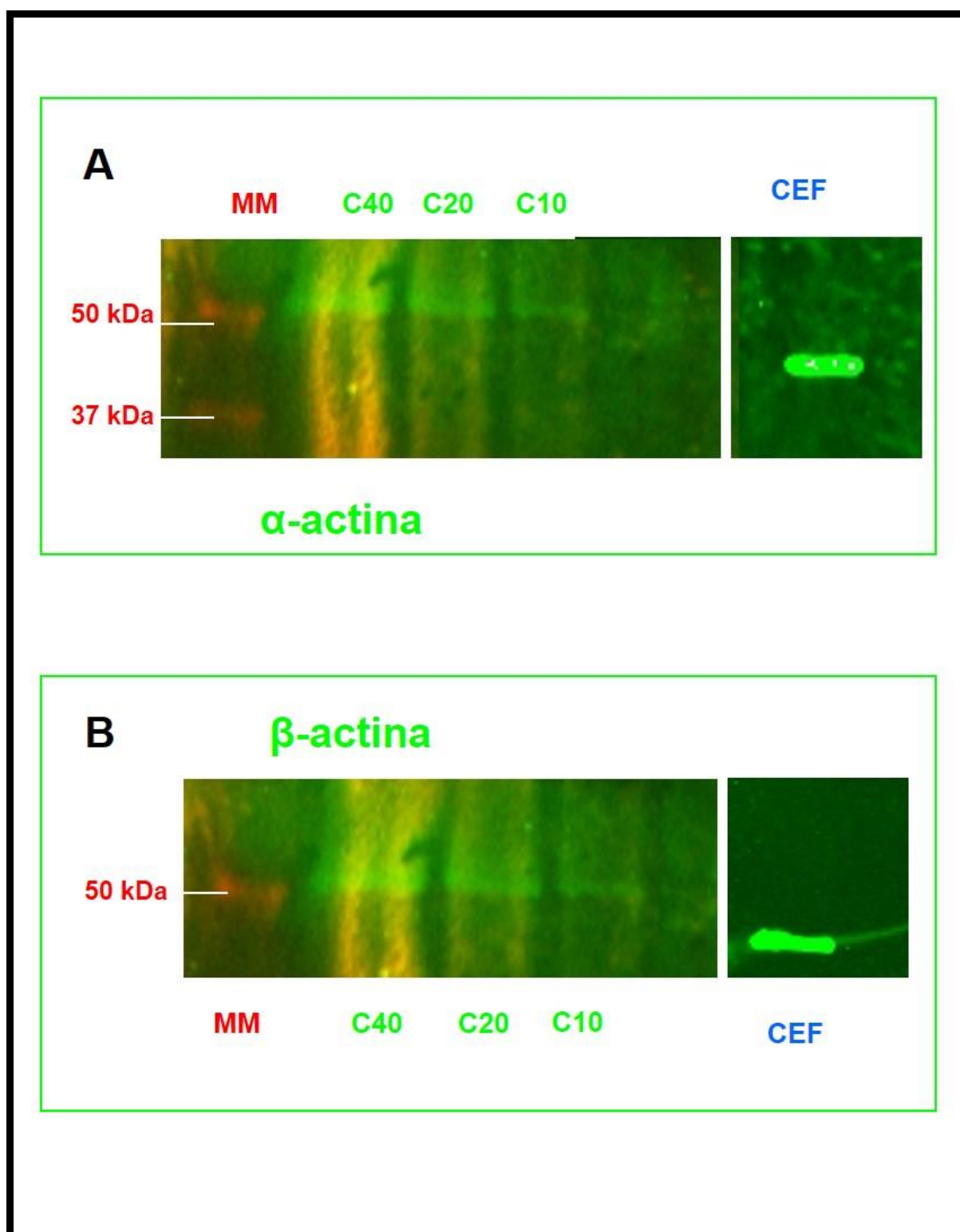


Figura 73. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del líquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con (A) anti- α -actina, (B) anti- β -actina. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 37, 50 KDa.). Se observan en verde, las bandas correspondientes a la actina de cianobacterias C10, C20, C40, utilizando 10, 20 y 40 μ g de extracto proteico, respectivamente. Control: CEF= células embrionarias de fibroblastos de ratón de 10,5 días.

13.2.1. Electroforesis 2D, actina

Se realizaron 3 electroforesis 2D en tándem, donde la cantidad de extracto proteico de cianobacterias para la primera dimensión fue de 100 µg. Como control positivo se utilizó 20 µg de extracto de proteínas de cianobiontes obtenidos a partir de *P. canina*. Tras la tinción del gel las proteínas aparecieron formando manchas circulares. Uno de los geles fue revelado con azul de Coomassie (Gel Code Blue stain reagent, Pierce, Rockford, IL, USA), mientras que los otros dos fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti-β-actina (Sigma A2228) y anti-α-actina (Abcam, ab 40863) respectivamente, diluidos ambos 1/1.000 en 4 mL de tampón PBS-tween al 1 % y tampón de bloqueo (ODYSSEY Infrased Imaging system) en proporción 1:1.

La tinción con azul de Comassie reveló dos bandas con una masa molecular de 50 y 55 kDa respectivamente formadas por puntos de grosor variable con un pI entre pH 4 y 6 (Figura 74).

La membrana de nitrocelulosa incubada con anti-α-actina (Abcam, ab 40863), reveló un único punto con una masa de ligeramente superior a 50 kDa, coincidiendo con la banda superior que aparece en la tinción de Comassie. Sin embargo cuando la membrana es incubada con el anticuerpo anti-β-actina (Sigma A2228), aparecen varios puntos formando una banda con la misma movilidad electroforética y un peso molecular de 50 kDa, coincidiendo con la banda inferior de la tinción de Comassie. De nuevo, en ambas membranas aparecen proteínas marcadas con un punto isoeléctrico entre pH 4 y 6.

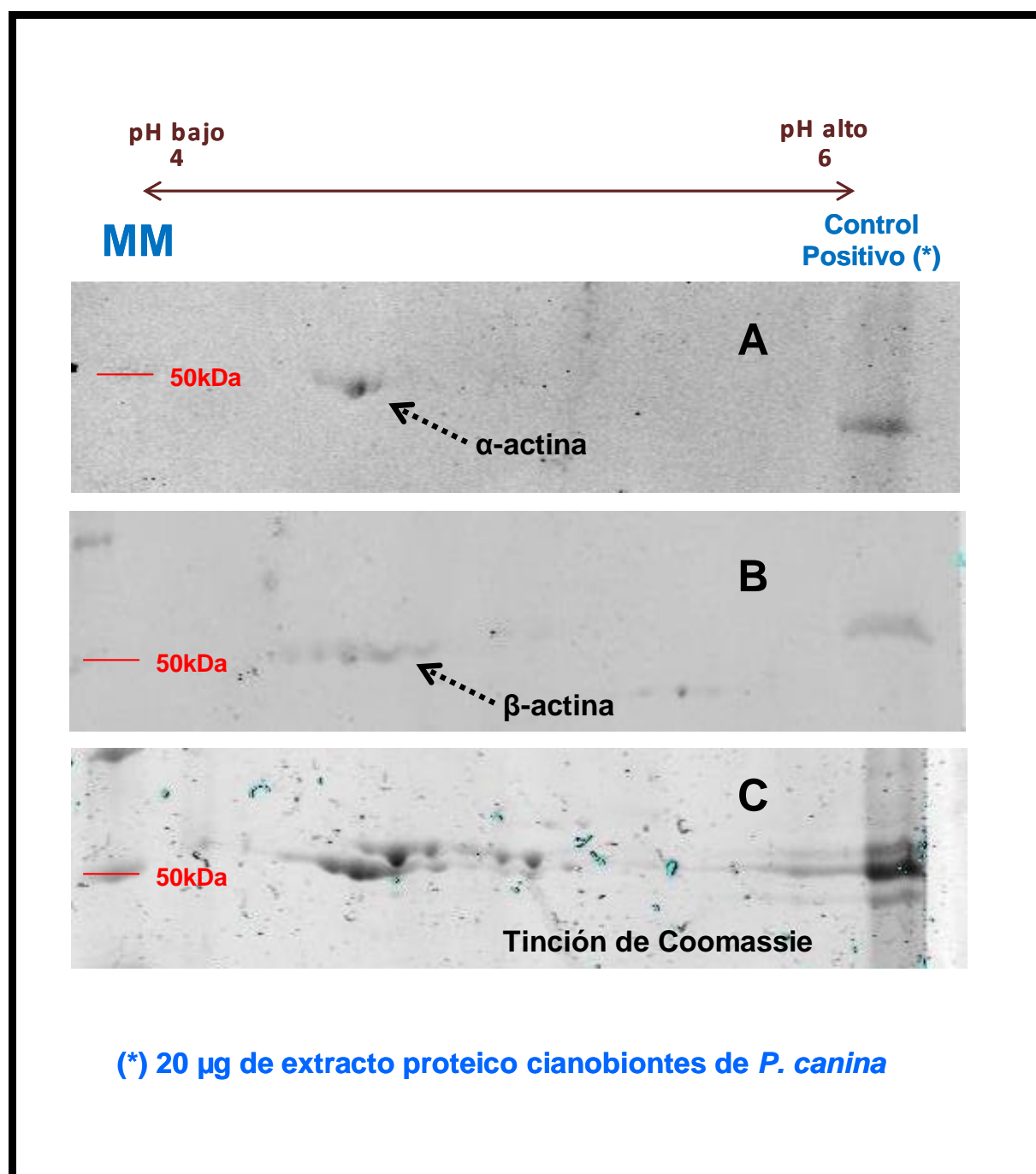


Figura 74. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina*, separado por electroforesis 2D en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. (A) Membrana incubada con anti-α-actina. (B) Membrana incubada con anti-β-actina. (C) Gel revelado con azul de coomasie. En rojo se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 50 KDa). Se utilizaron 100 µg de extracto proteico en todos los casos menos en el control positivo.

13.3. Distribución espacial de la actina presente en el citoesqueleto mediante el anticuerpo anti- β -actina unido a ferritina

Cianobacterias aisladas fueron incubadas con ferritina-anti- β -actina. Previamente al marcaje las cianobacterias fueron incubadas con lectina fúngica ($0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 4 horas, tanto en presencia como en ausencia de latrunculina-A $10 \text{ }\mu\text{M}$. Con el fin de demostrar que los patrones de tinción fueron generados exclusivamente por la actina, las células control expuestas a la ferritina unida a anti- β -actina no fueron incubadas con la lectina de hongos.

Las micrografías revelaron la presencia de actina en el interior de los cianobiontes (Figura 75). Se observaron puntos negros así como fibras a lo largo de la célula, mucho más concentrados en las zonas periféricas cercanas a la membrana celular (Figura 75-A). La densidad fue mayor con respecto al control en todos los casos, aunque las células en contacto con la lectina presentaron una forma polarizada en la mayoría de los casos (Figura 75-B).

En el caso de cianobiontes tratados previamente al marcaje con latrunculina-a el número y densidad de puntos negros, debidos a la unión de la ferritina-anti- β -actina, se redujo considerablemente (Figura 75-C). Los cambios morfológicos observados después de la aplicación del fármaco, fueron significativamente menores. Con el fin de demostrar que los patrones de tinción fueron generadas exclusivamente por la actina, las células control no expuestas a la ferritina unido al anti-actina sin la incubación previa con la lectina, no exhibieron depósitos negros. Así mismo, las micrografías mostraron pequeños filamentos de actina polimerizada ancladas a la membrana plasmática, tal y como se observa en la figura 76.

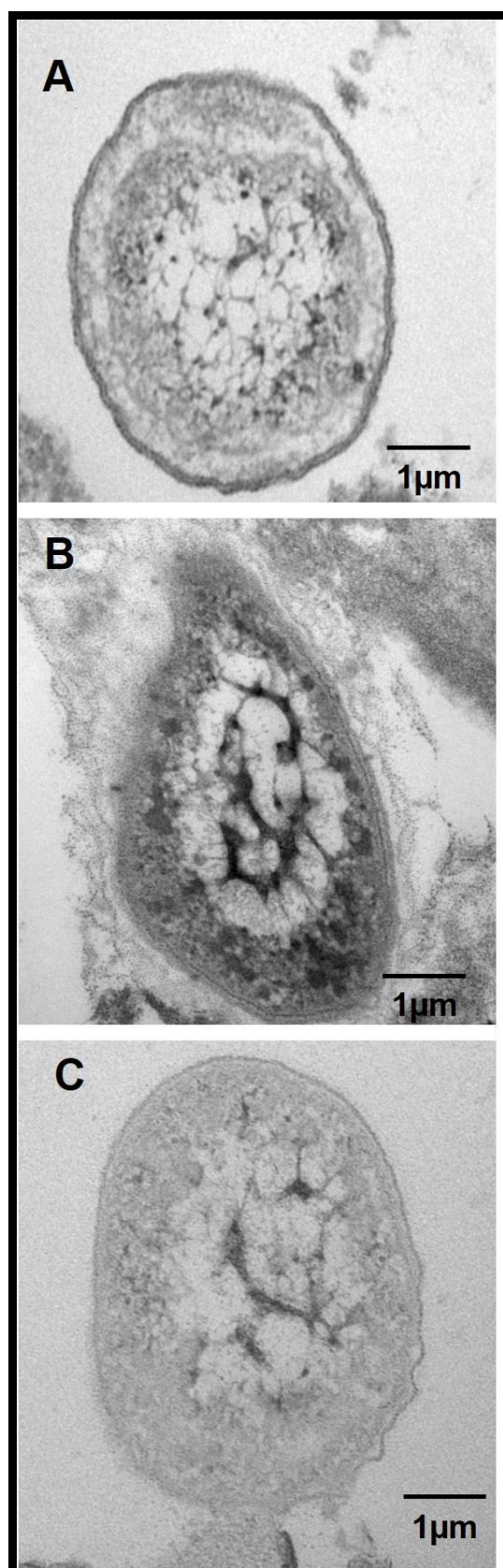


Figura 75. Micrografías de transmisión de células *Nostoc* aisladas a partir de talos de *P. canina* e incubadas con anti- β -actina unida a ferritina. (A) Cianobiontes no expuestos al anticuerpo unido a la actina ni a la lectina fúngica. (B) Cianobiontes previamente incubados con 20 ng de lectina fúngica durante 4 h. (C) Células *Nostoc* incubadas previamente con 20 ng de lectina fúngica durante 4 h, incluyendo latrunculina-A 10 μ M en la mezcla.



Figura 76. Detalle de micrografía de transmisión de una cianobacteria *Nostoc* aislada a partir de talos de *P. canina* e incubadas con anti- β -actina unida a ferritina. Las flechas rojas señalan la zona de unión entre los filamentos de actina polimerizada y la membrana plasmática.

13.4. Distribución espacial de la actina mediante microscopía confocal

La visualización de los cianobiontes mediante microscopía óptica confocal, reveló variaciones entre tratamientos así como un marcaje diferencial entre secciones de la misma muestra. Las series fotográficas obtenidas fueron elegidas de una larga serie de fotografías realizadas a lo largo del eje Z, donde la fluorescencia verde emitida por el fluorocromo Alexa Fluor® 488 unido a faloidina muestra la localización de la actina polimerizada en el interior celular.

Las fotografías de los cianobiontes control mostraron una distribución del marcaje homogéneo a lo largo de las diferentes capas, con acúmulos de mayor intensidad (Figura-77).

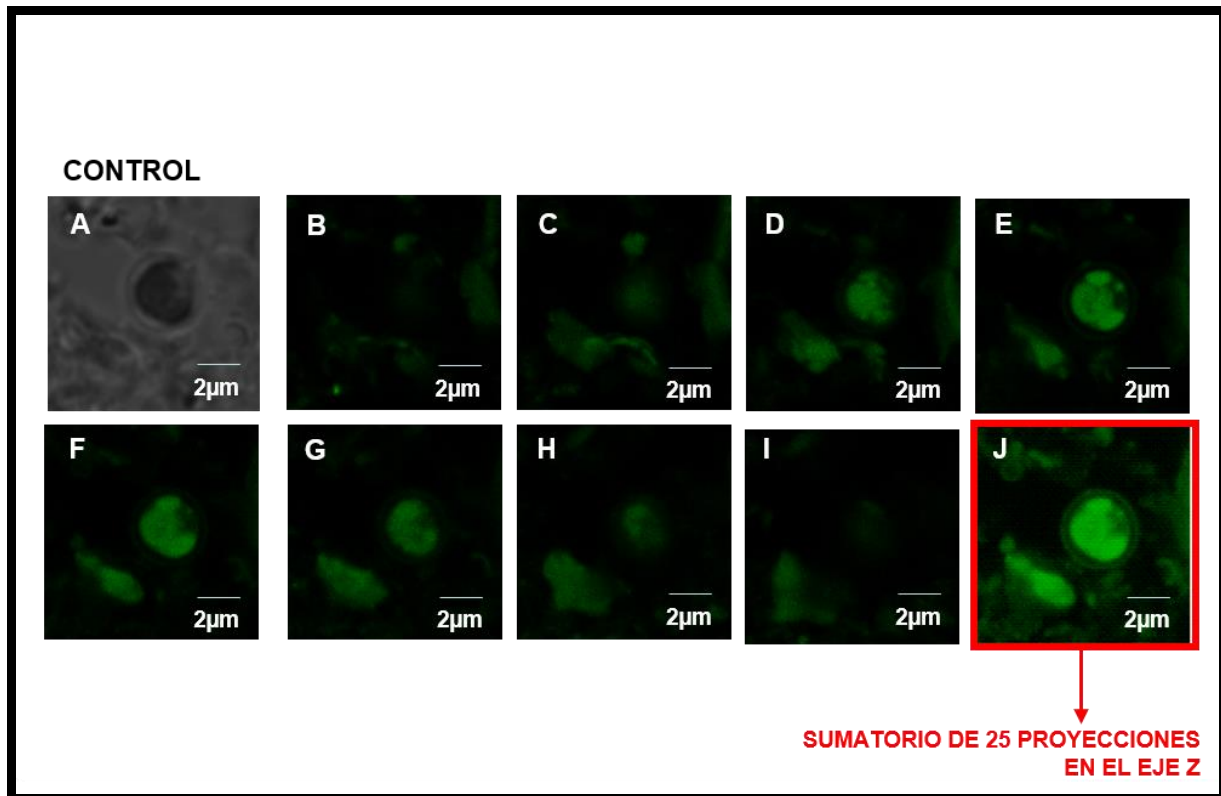


Figura 77. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* control (no expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen). La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular.

Los fotobiontes incubados con lectina fúngica mostraron una distribución polarizada del fluorocromo tras el análisis realizado en eje Z, perpendicular a la horizontal de la muestra (Figura 78). La zona media de la célula analizada (Figura 78-E/F/G) presentó un verde más intenso en una zona concreta respecto a las demás capas analizadas y su distribución no fue homogénea cuando se analizó la proyección en 2D del total de imágenes obtenidas (Figura 78-K).

Las series fotografías obtenidas para el tratamiento conjunto de lectina y latrunculina-A 10 µM mostraron un marcaje mucho menor en todos los casos analizados así como en la suma de todas sus capas (Figura 79).

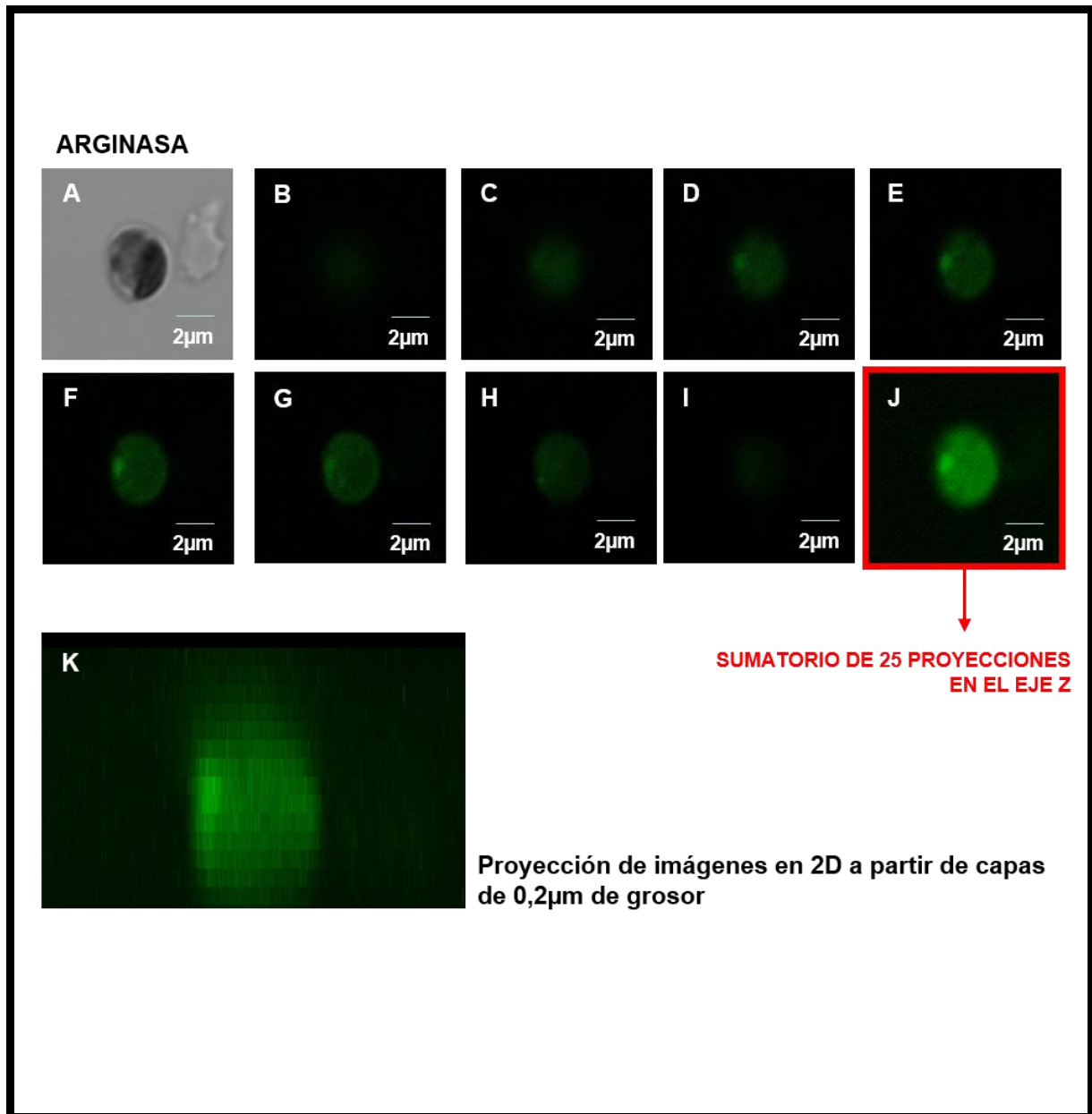


Figura 78. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen. La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular. La fotografía K es el resultado de la proyección en 2D del total de imágenes obtenidas.

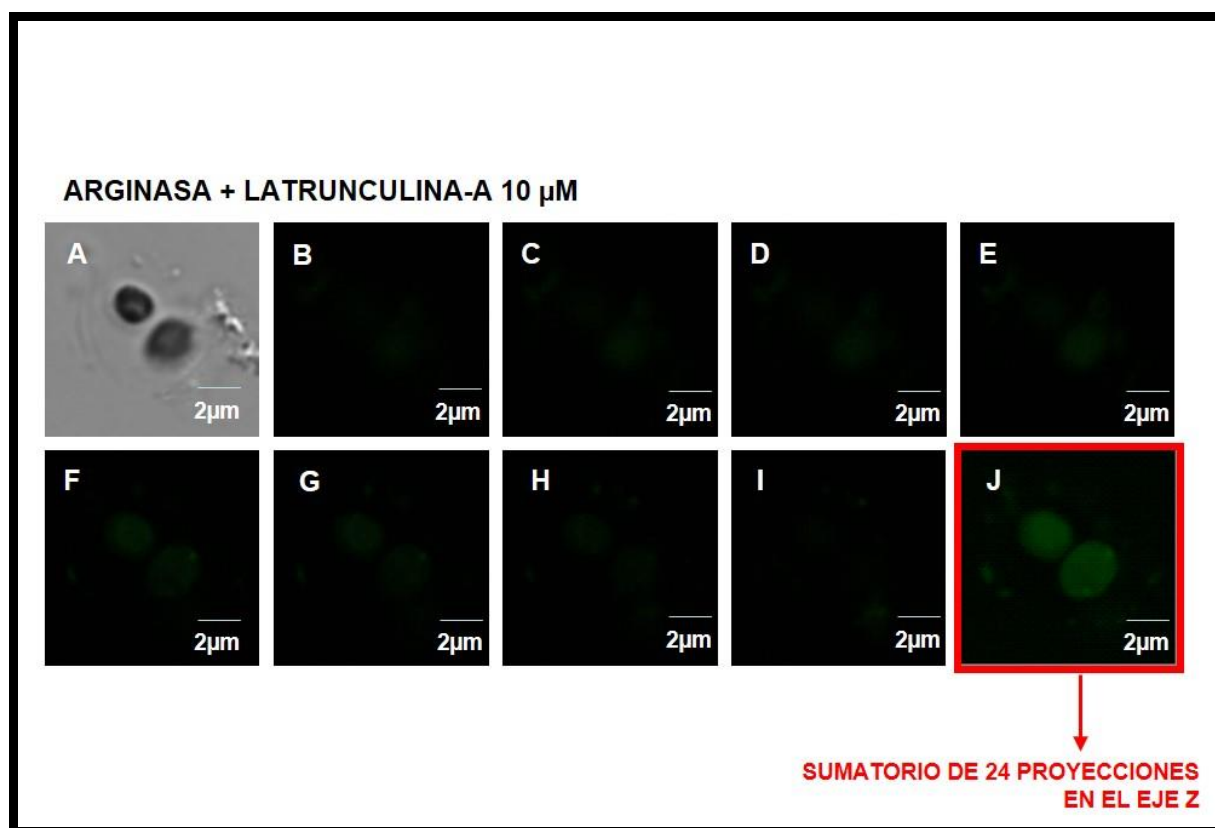


Figura 79. Selección óptica realizada a partir de una serie fotográfica obtenida por microscopía confocal a lo largo del eje z y su proyección en cianobiontes de *P. canina* control expuestos a la lectina fúngica del mismo líquen y a latrunculina-A 10 μ M. La fotografía A muestra la imagen en contraste de fase, para poder localizar la fluorescencia emitida dentro del contexto celular.

14. ANTICUERPOS DE MIOSINA SE UNEN A EPITOPOS ESPECÍFICOS EN CIANOBIONTES DE *P. CANINA*

Cianobacterias recién aisladas (20 mg), fueron sometidas a una lisis para obtener el contenido proteico de las mismas. Para ello se utilizó 500 μ L de tampón de lisis que contenía: cloruro de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM, triton 100x al 0,5 % (v/v), cóctel inhibidor de proteasas (complete TM, Roche) al 1x1.000 (v/v) y BME 0,2 M. El contenido proteico total fue 4,9 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹.

Las proteínas obtenidas se separaron en un gel de poliacrilamida al 7 % y/o 15 % de SDS, dependiendo la cadena (pesada o ligera) a estudiar. Se utilizaron 60 μ g de proteínas, 5 μ g células de ovario de hámster chino (CHO) como control positivo y una mezcla de proteínas (11-245 kD) BlueStar PLUS Prestained Protein Marker Tris-Glycine 4-20 %, para determinar el peso molecular.

Para la localización de las cadenas pesadas de miosina se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti-miosina de conejo deslipidizada, (Sigma M7648).
- Anti-MNHC II A de ratón (Covance PRB-440P), anticuerpo policlonal.
- Anti-MNHC II B de ratón (Covance PRB-445P), anticuerpo policlonal.
- Anti-MNHC II A de ratón (Anaspec 55308), anticuerpo policlonal.
- Anti-MNHC II B de ratón (Anaspec 55309), anticuerpo policlonal.

De todos los anticuerpos utilizados, dieron respuesta únicamente los anticuerpos (Figura 79):

- Anti-MNHC II A policlonal (Covance PRB-440P), correspondiente al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada de la miosina no muscular humana isoforma A, para humano, ratón y bovino.
- Anti-MNHC II B policlonal (Covance PRB-445P), correspondiente al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada de la miosina no muscular humana isoforma B, para humano y ratón.

Se reveló una banda con una masa molecular en torno a 200-230 kDa en ambos casos. La fracción perteneciente al control (CHO) reveló una banda con una movilidad electroforética de 230 kDa (propia de las cadenas pesadas de miosina II de mamíferos) igual que la observada para los cianobiontes de *P. canina* así como una segunda banda, de menor intensidad, de 135 kDa (Figura 80).

Los anticuerpos utilizados para la localización de las cadenas ligeras de miosina fueron:

- Anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Rockland Biochemical 600-401- 938) anticuerpo policlonal.
- Anti-fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Cell Signaling 3671) anticuerpo policlonal.
- Anti- miosina MLC2 (Thr18/Ser19) de conejo (Cell Signaling 3672) anticuerpo policlonal.
- Anti- difosfo miosina MLC (Thr18/Ser19) de conejo (Cell Signaling 3674) anticuerpo policlonal.
- Anti-miosina MYH2 (N2.261) de ratón (Santa Cruz sc-53096), anticuerpo monoclonal.

- Anti-miosina MYH1/2/3 (N3.36) (Santa Cruz sc-53092), anticuerpo monoclonal.
- Anti- miosina MLC (Clon MY-21) de conejo (Sigma M4401) anticuerpo monoclonal.

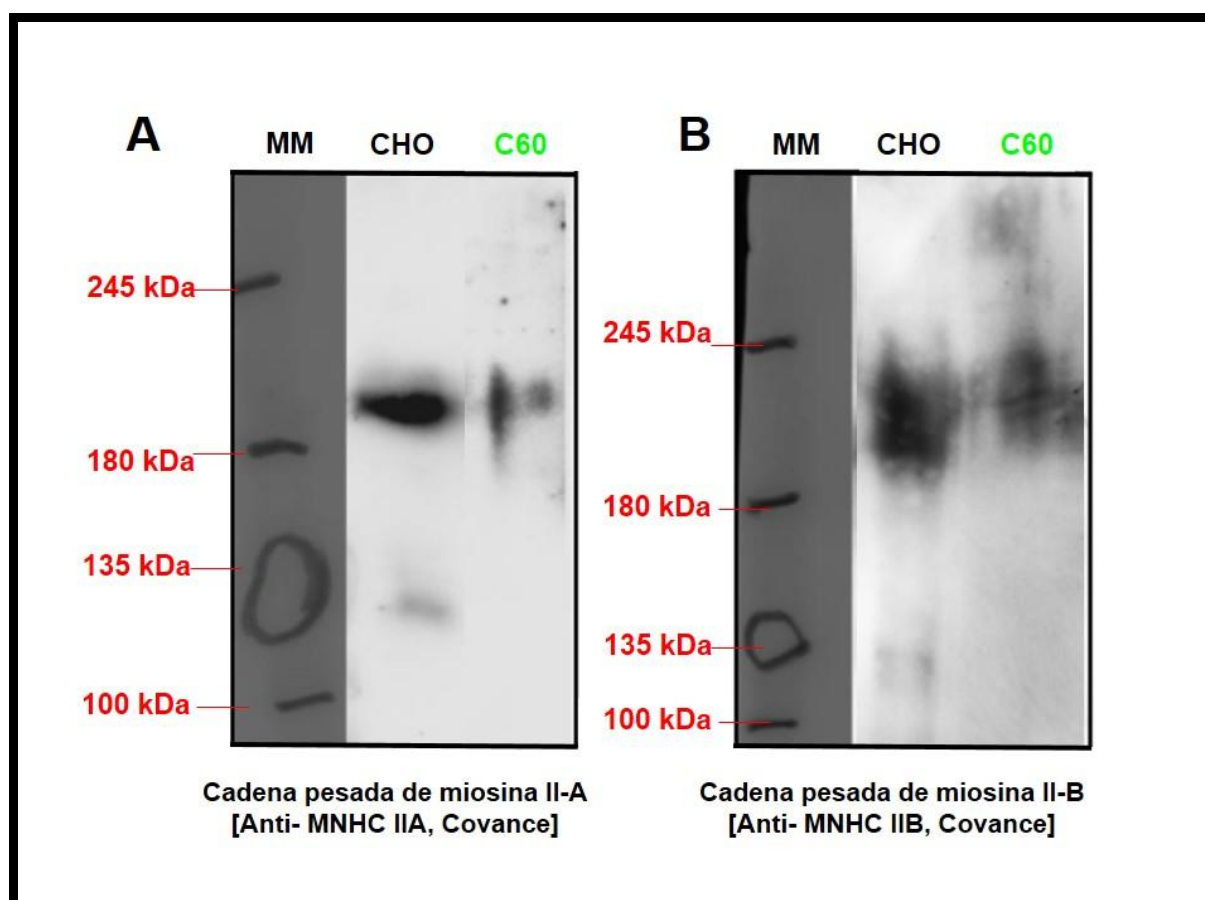


Figura 80. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos de cadena pesada de miosina (A) II-A y (B) II-B. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 180, 135, 100 KDa). La calle correspondientes a la actina de cianobacterias es C60, utilizando 60 µg de extracto proteico, en ambos casos Control: CHO= células de ovario de hámster chino.

Sin embargo, los anticuerpos que dieron una inmunorespuesta positiva frente a las proteínas de cianobiontes de *P. canina* fueron:

- anti-miosina MLC (Clon MY-21) (Sigma M4401), reacciona con miosina de pollo, cerdo, bovino, de conejo y de músculo humano.
- anti- difosfo miosina MLC (Thr18/Ser19) (Cell Signaling 3674), reacciona frente a miosina de vaca, pollo, aves, pescado, pez cebra, humano, ratón, cerdo rata y anfibios del género *Xenopus*.
- anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) de conejo (Rockland), reacciona frente a la cadena ligera de la miosina no muscular de. humano, rata y ratón.

En todas las membranas analizadas el control presentó principalmente una banda muy marcada cuyo peso molecular fue de 20 kDa y otra banda de 48 kDa de grosor variable, según anticuerpo (Figura 81).

La membrana de nitrocelulosa incubada con anti-miosina MLC (Clon MY-21), reveló una única banda con una masa de 48 kD para la calle de los cianobiontes, coincidiendo con la banda superior que aparece en el control. Para los anticuerpos anti-difosfo miosina MLC (Thr18/Ser19) (Cell Signaling 3674) y anti- fosfo miosina MLC (Ser 19) (Rockland), los cianobiontes mostraron de nuevo la misma banda a 48 kDa así como una nueva banda cuyo peso molecular fue el mismo que la banda presente en el control, 20 kDa.

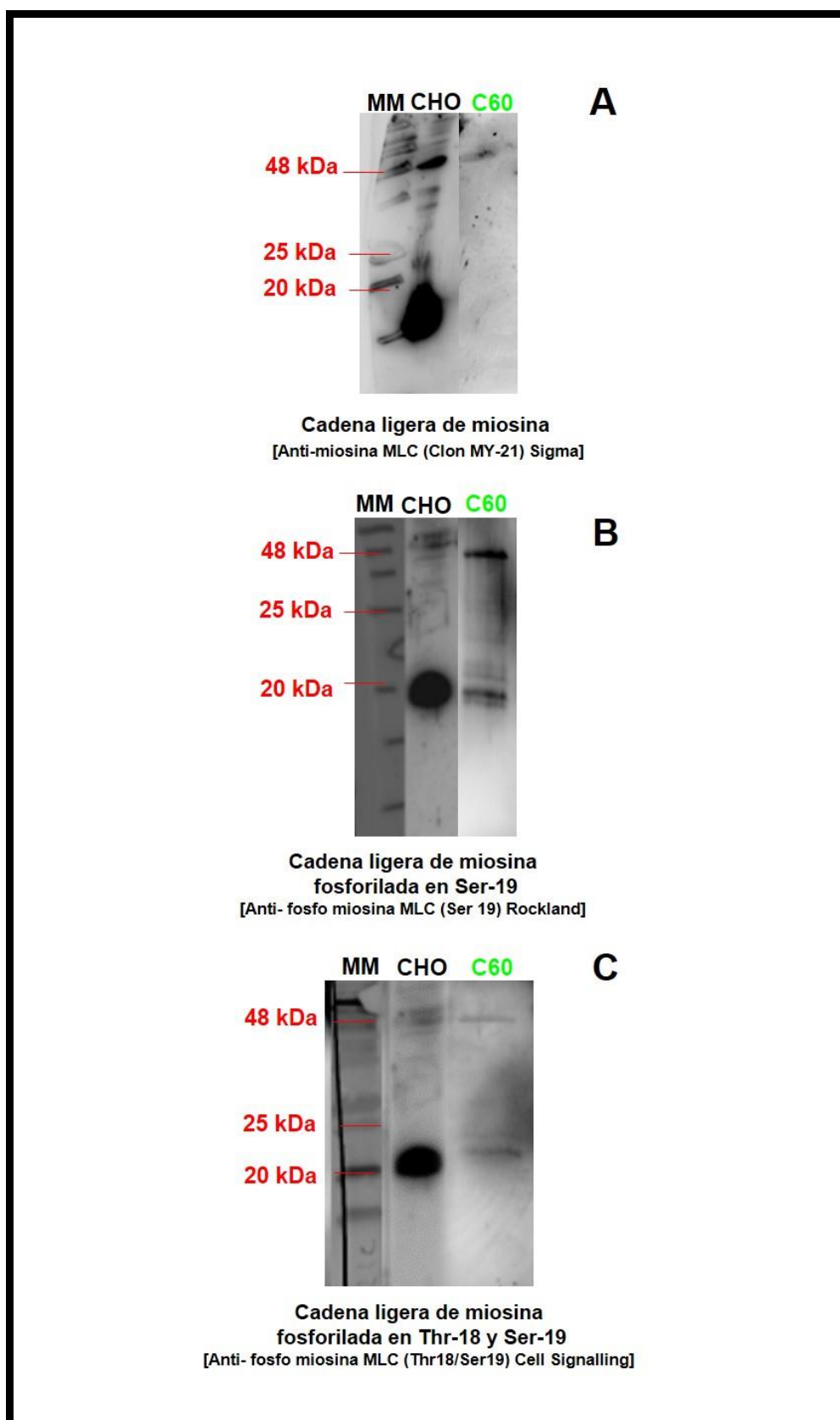


Figura 81. Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con: anti-cadena ligera de miosina, anti-cadena ligera de miosina fosforilada en serina 19 y serina 19 y triptófano 18. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 20, 25, y 48 KDa.). Se observan, las bandas correspondientes a la actina de cianobacterias C60, utilizando 60 µg de extracto proteico, respectivamente. Control: CHO= células de ovario de hámster chino.

Mediante la utilización del anticuerpo de conejo anti-fosfo miosina MLC (Ser 19) (Rockland Biochemical 600-401-938) se analizaron las posibles variaciones de fosforilación de la miosina en los cianobiontes de *P. canina* en función del tiempo de contacto con la lectina fúngica. Para ello, cianobiontes previamente aislados fueron incubados en presencia de arginasa del mismo liquen durante 20, 50 y 225 min en agitación suave y temperatura ambiente.

El revelado de la membrana mostró una banda de peso molecular 48 kDa (Figura 82). Dicha banda presentó diferente intensidad según tratamiento y fueron analizadas en conjunto mediante un análisis de densitometrado. La densidad relativa fue máxima a los 20 min de contacto con la lectina para luego disminuir a los 50 min y mantenerse constante hasta los 225 min.

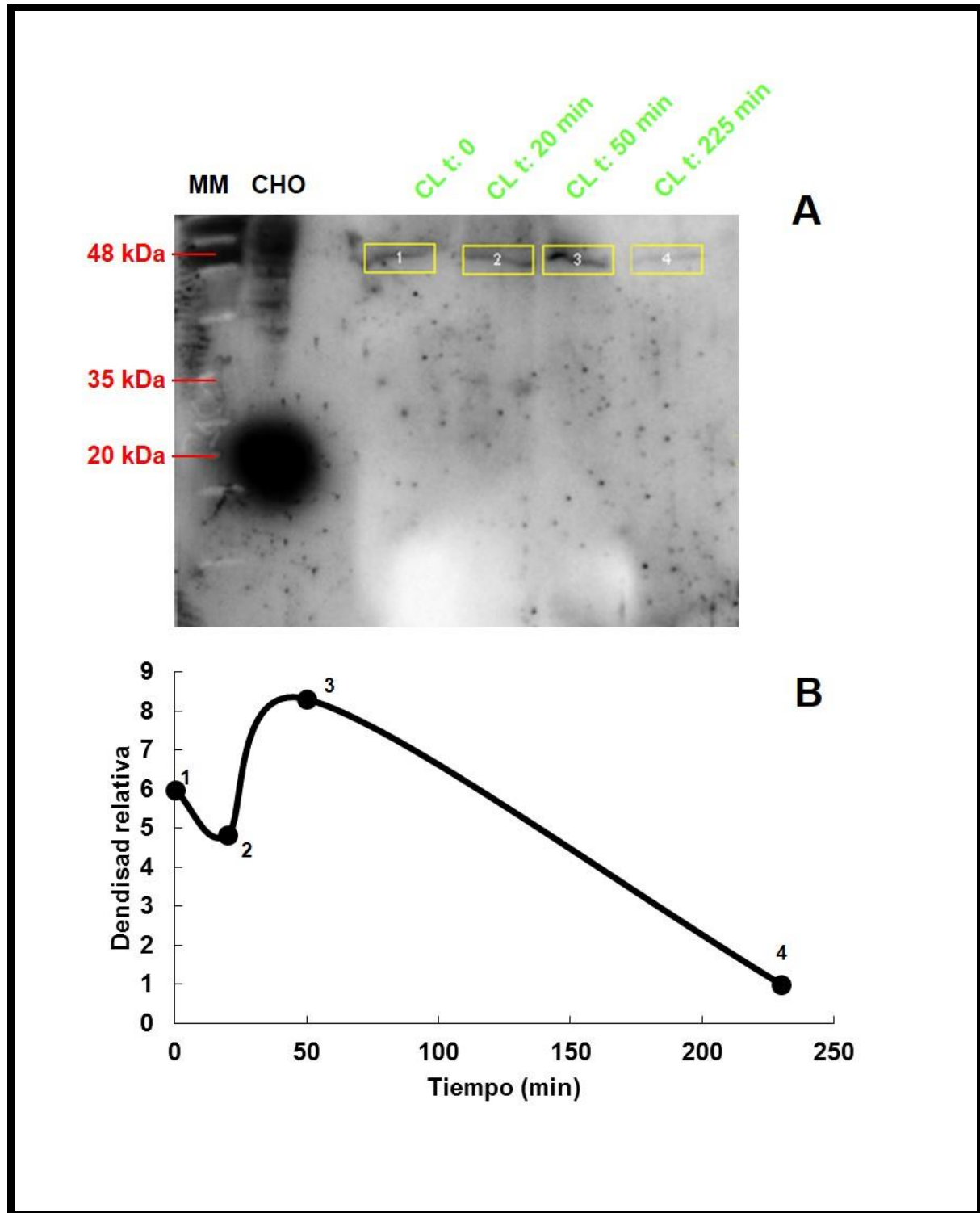


Figura 82. (A) Imagen del extracto proteico de *Nostoc* obtenido a partir del liquen *P. canina* separado por electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferido a membrana de nitrocelulosa. Los cianobiontes fueron previamente incubados en presencia de lectina fúngica (0, 20, 50 y 225 min). Las membranas fueron incubadas con: anti-cadena ligera de miosina fosforilada en serina 19. Se indica la ubicación de las bandas del marcador de pesos moleculares (MM= 20, 25, y 48 KDa). Se observan, las bandas correspondientes a la miosina de cianobacterias, utilizando 60 µg de extracto proteico, respectivamente. Control: CHO= células de ovario de hámster chino. (B) Densidad relativa de las bandas, el valor obtenido para cada tiempo de incubación es la relación de dicho valor.

15. ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGUALCIÓN DE LA MOTILIDAD EN LAS CIANOBACTERIAS

15.1. El AMPc y el GTP revierten la inhibición del movimiento producida por inhibidores de la actina y miosina II

Se analizó el efecto del AMPc a concentraciones crecientes (0,2 mM a 24 mM) sobre cianobacterias tratadas con inhibidores del citoesqueleto eucariótico tales como blebistatina (25 μ M) y faloidina (10 μ M). La figura 82 muestra el número de cianobacterias en el interior del capilar después de la adicción del AMPc. Se realizaron dos controles, uno de ellos en ausencia de inhibidores. Cuando los inhibidores fueron combinados con AMPc, la motilidad celular hacia la lectina fue recuperada y el número de células contabilizadas en el interior del capilar fue en aumento a medida que la concentración de AMPc era mayor.

La misma tendencia se observó en los cianobiontes incubados con blebistatina y faloidina en presencia de concentraciones crecientes de GTP. Cuando las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina y combinadas con GTP a concentraciones crecientes, el número de células en el interior del capilar fue en aumento hasta alcanzar los niveles del control, en ausencia de los inhibidores (Figura 83).

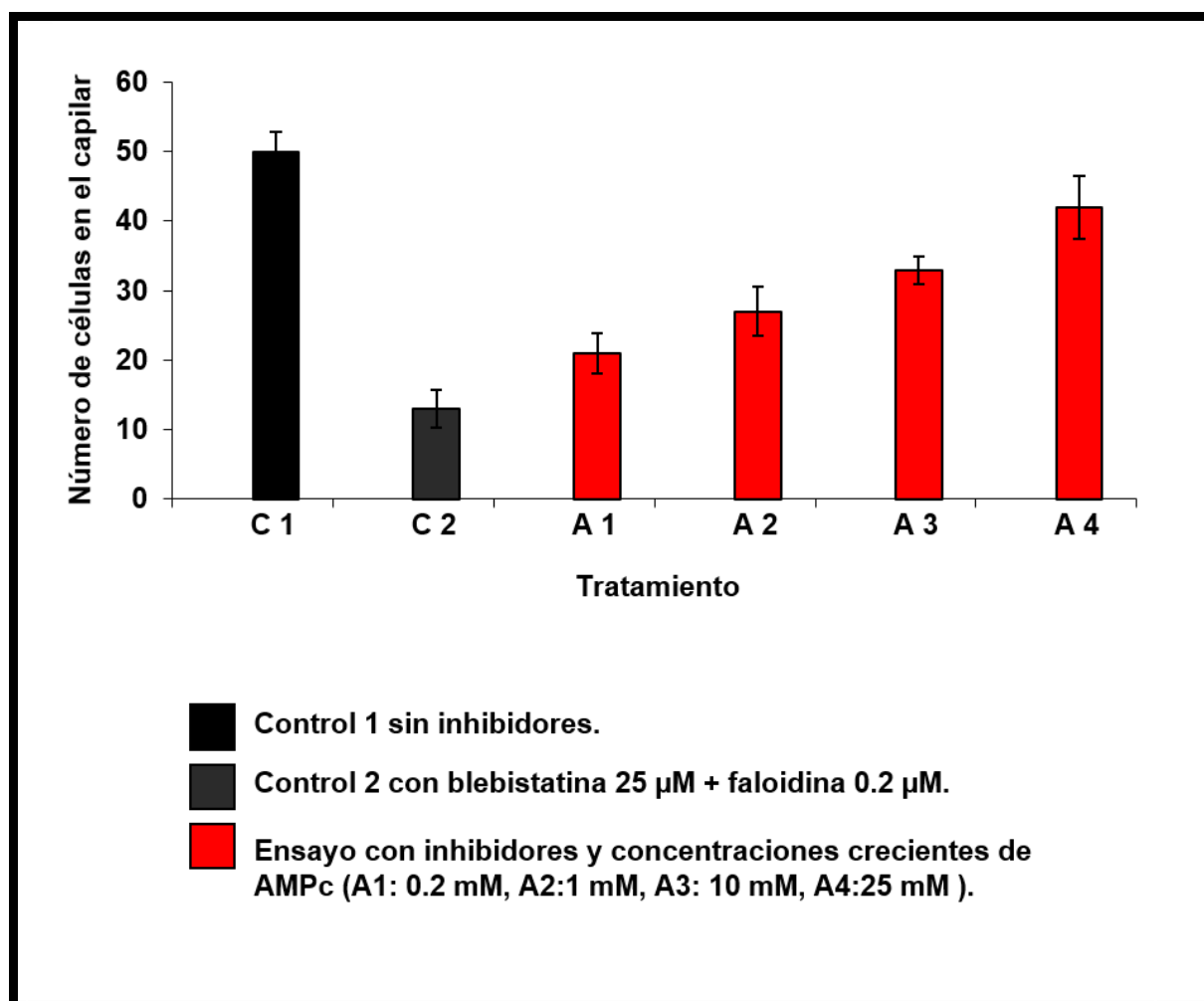


Figura 83. Efecto del AMPc en la motilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio líquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores y AMPc. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

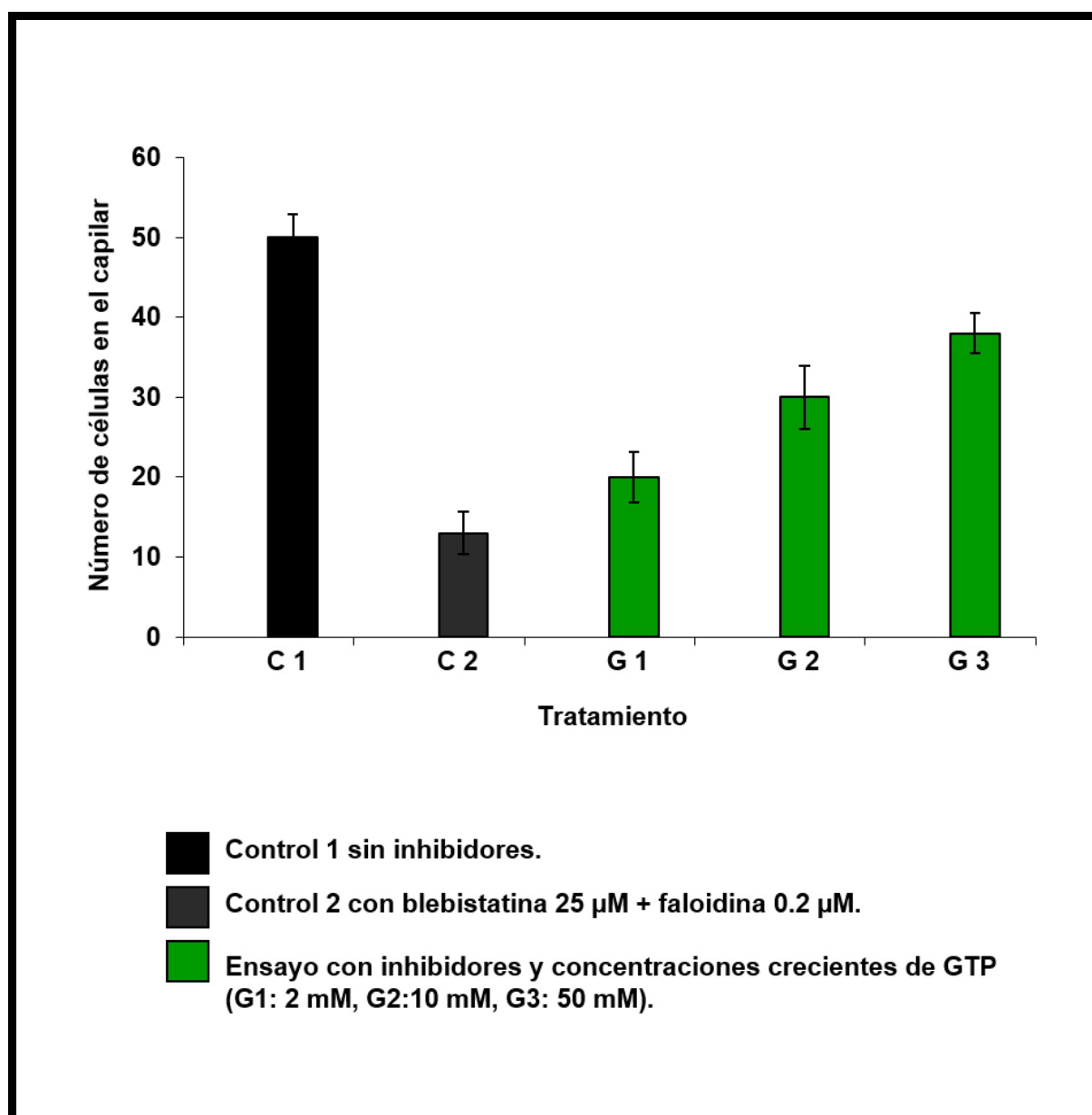


Figura 84. Efecto del GTP en la motilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio líquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores y GTP. El valor obtenido es la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

15.2. Análogos del GTP como GTP γ (s) y GDP β (s), modifican el efecto de los inhibidores blebistatina y faloidina

Se analizó el efecto de GTP 50 mM y fue comparado con el producido por análogos del mismo, GTP γ (s) 22mM y GDP β (s), 5mM sobre cianobacterias tratadas con inhibidores de la miosina II y actina tales como blebistatina (25 μ M) y faloidina (10 μ M).

Después de 4 h de incubación con 20 ng de lectina fúngica aislada a partir de *P. canina* se contabilizaron 48 células en el interior del capilar. Los inhibidores provocaron una reducción de la motilidad. GTP 50 mM, en ausencia de inhibidores, provocó la entrada de 38 células. Así mismo, cuando las cianobacterias son incubadas con blebistatina, faloidina y combinadas con GTP 50 mM el número de cianobacterias fue 39, mientras que con GTP γ (s) 22mM y GDP β (s) 5 mM fue 53 y 44 respectivamente (Figura 85).

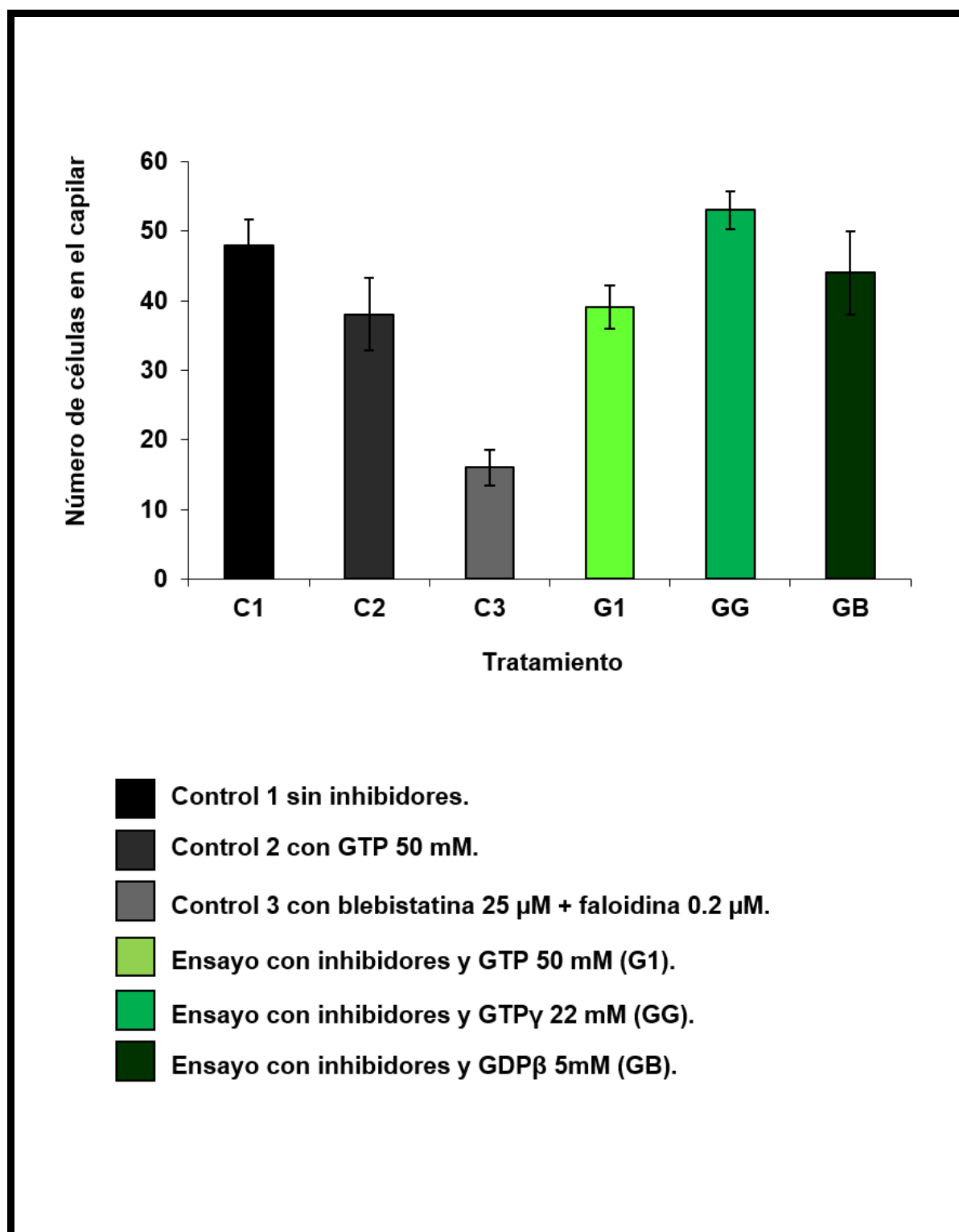


Figura 85. Efecto del GTP, GTP γ y GDP β en la motilidad de cianobiontes de *P. canina* hacia 20 ng de lectina obtenida a partir del propio líquen. Las cianobacterias fueron incubadas con blebistatina y faloidina durante 4 h así como con los inhibidores, GTP GTP γ (s) y GDP β (s). Los valores obtenidos fueron representados como la media del número de células por campo en tres réplicas. Las barras verticales representan el error estándar de las medias.

DISCUSIÓN

1. EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO LECTINA-LIGANDO ENTRE BIONTES DE LÍQUENES ES UNIVERSAL E INDEPENDIENTE A LA NATURALEZA DE LAS ESPECIES QUE LO CONFORMAN

Las lectinas vegetales están envueltas en el reconocimiento celular. Sin embargo, determinadas actividades enzimáticas específicas han sido encontradas asociadas a algunas lectinas (Molina *et al.*, 2000; Sacristán *et al.*, 2008). Varias especies del género *Peltigera* se han asociado con la producción de las lectinas o proteínas extracelulares con propiedades similares a la lectinas (Lockhart *et al.*, 1978; Petit, 1982; Petit *et al.*, 1983; Lehr *et al.*, 1995; Feoktistov *et al.*, 2009) sosteniendo la idea de hacer extensible un mecanismo de reconocimiento entre biontes propio de clorolíquenes para cianolíquenes, sobre la base de similitudes estructurales y funcionales entre lectinas de cloro- y cianolíquenes.

Los receptores del fotobionte que reconocen las lectinas producidas por el hongo liquenizado (Legaz *et al.*, 2004), son esenciales para el mantenimiento de la asociación, donde, la verdadera ubicación de esta enzima es un punto crucial para la relaciones de compatibilidad entre un hongo y su potencial fotobionte. La presencia de ureasa glicosilada en clorolíquenes como *E. prunastri* se utilizó como referencia para el estudio del ligando presente en las paredes de los cianobiontes de *P. canina*. La inducción con urea reveló la presencia de una proteína con actividad ureasa (Figura 41) principalmente localizada en las paredes de los cianobiontes, aunque en algunas células aparecieron pequeños gránulos polidispersos indicando actividad intracelular. Esta distribución de la ureasa podría ser sorprendente pero, para su mejor comprensión, debe considerarse la composición del talo líquénico, 90 % hongo y 10 % fotobionte en términos de volumen total (Collins & Farrar, 1978). La mayor parte de la urea exógena es probablemente capturada por el componente fúngico de los espacios intercelulares, mientras que la principal oportunidad para los fotobiontes sería la hidrólisis superficial de esta urea, en contacto con la superficie externa, por la ureasa de la pared celular. Esto está de acuerdo con la conservación de la actividad de la enzima por inmovilización de la ureasa en matrices inertes tales como celulosa (Wang *et al.*, 1998), alginato (Das *et al.*, 1998) o gelatina (El-Shora, 2001), las cuáles conservan un entorno hidrófilo suficiente para llevar a cabo la catálisis por parte de la enzima inmovilizada. La actividad ureasa encontrada en talos de *P. canina* (Figura 43) es semejante a la observada en clorolíquenes como *E. prunastri* o *C. dentroides* (Pérez-Urria & Vicente, 1985; Vicente & Legaz, 1988; Legaz & Vicente 1989; Legaz *et al.*, 2006), en los que se ha encontrado que la ureasa es una enzima no-constitutiva pero inducible a partir de líquenes aislados.

Hay dos hechos que manifiestamente afectan al estudio de las lectinas como factores de reconocimiento de algas compatibles. El primero fue descrito por Bubrick y Galun (1980) y Bubrick y colaboradores (1981, 1985) al demostrar que una proteína capaz de unirse al clorobionte de *X. parietina* podía también unirse a clorobiontes de especies filogenéticamente cercanas entre *Teloschitaceae* como *Caloplaca regalis* por ejemplo, pero no a clorobiontes filogenéticamente alejados como los procedentes de *Usnea*, *Cladonia* o *Ramalina*.

El segundo hecho experimental importante, fue encontrar la presencia de lectinas en cianolíquenes (Lockhart *et al.*, 1978; Petit, 1982; Petit *et al.*, 1983) y que el receptor para dichas lectinas fuera una ureasa galactosilada similar a la encontrada en clorobiontes (Sacristán *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2009; Vivas *et al.*, 2010), pudiéndose usar la ureasa segregada por talos de clorolíquenes en una rápida y eficiente purificación de la lectina, uniendo dicha ureasa a agarosa activada con bromuro de cianógeno. Debido a que la unión de la lectina fúngica a su ligando de pared en algas implica inactividad para hidrolizar arginina en clorolíquenes, se consideró la hipótesis de que las lectinas segregadas a partir de talos de *P. canina* pudieran ser capaces de unirse a ureasas de pared de forma temporal y perder su función enzimática. La capacidad de unirse a lectinas comerciales de muchos ficobiontes, con la pérdida de actividad arginasa (Molina & Vicente, 1993) que ello supone y su posterior recuperación tras una segunda incubación con azúcares simples, se tomó como punto de partida para el diseño de un método de aislamiento y purificación de arginasa segregable por el cianolíquen *P. canina* por cromatografía de afinidad, utilizando ligados de pared obtenidos a partir de *E. prunastri*. Este procedimiento ha demostrado su validez al prepurificar la lectina producida por *P. canina*, como se muestra en la Figura 42. La lectina de *Peltigera*, purificada por esta vía, desarrollaba secundariamente actividad arginasa al igual que las lectinas de *X. parietina* (Molina *et al.*, 1993), *E. prunastri* (Legaz *et al.*, 2004) y el cianolíquen *L. corniculatum* (Vivas *et al.*, 2010).

La desorción de la arginasa llevada a cabo por α -D-galactosa 50 mM, indicaría que la lectina usa el mismo ligando poligalactosilado presente en los clorolíquenes. Las lectinas producidas por el talo líquénico reconocen células *Nostoc* compatibles y este proceso es altamente específico. Los resultados aquí obtenidos coinciden con los relativos a lectinas aisladas de clorolíquenes (Legaz *et al.*, 2004) así como de otros cianolíquenes (Lehr *et al.*, 1995; Rai *et al.*, 2000; Sacristán *et al.*, 2007; Vivas *et al.*, 2010). Pteridofitas del género *Azolla* producen lectinas que reconocen restos de azúcar en la superficie celular de cianobacterias *Nostoc* pre-simbióticas (Bergman *et al.*, 1993). Miao y colaboradores (2012) han identificado *lec-1* como el gen responsable de la

codificación de lectinas en *P. membranacea*. La expresión de dicho gen era hasta dos órdenes de magnitud mayor en talos que incluían ambos simbios, en contraste con aquellos que carecían de fotobionte. La expresión de *lec-1* está influenciada por la presencia del fotobionte, consistente con un modelo de reconocimiento lectina-ligando, en el que *lec-1* actúa como un factor de reconocimiento en el establecimiento o mantenimiento de la asociación de simbiontes compatibles. Estas observaciones indican claramente que una mayor exploración de los genes que codifican la lectina dará lugar a una mayor comprensión de los factores que intervienen en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis.

Para obtener una evidencia experimental *in vivo* de la unión producida entre la lectina segregada por *P. canina* y su receptor de pared en los cianobiontes del mismo, se llevó a cabo una incubación de células simbióticas *Nostoc* con la lectina marcada con ITCF (Figura 45). La arginasa producida a partir de talos de *P. canina* y unida a un fluorocromo, fue capaz de unirse a la pared celular de los cianobiontes de manera similar a lo demostrado para clorobiontes (Molina *et al.*, 1993). Marx y Peveling (1993) visualizaron por fluorescencia cianobiontes aislados de diferentes especies liquénicas, capaces de unirse a lectinas, tales como ricina A, específica de α y β -D-galactosa. Los clorobiontes de *E. prunastri*, en presencia de arginasa marcada con un fluorocromo, se caracterizan por presentar una intensa fluorescencia verde principalmente sobre la pared celular (Sacristán *et al.*, 2006) debida a la unión de la lectina y su ligando. De una manera similar a lo descrito por Legaz y colaboradores (2004) para las lectinas de *X. parietina* y *E. prunastri*, la lectina de esta última especie y la de *Peltigera* no solo se unen a la pared celular de sus homólogos cloro- o cianobionte, sino que pueden unirse de forma cruzada (Figuras 47-C y 48-C) y ser desorbidas en extensión variable tras el tratamiento de las células con α -D-galactosa 100 mM, lo que confirmaría que la reacción de reconocimiento implica un dominio en la mitad peptídica de las lectinas capaz de establecer enlaces de afinidad con las moléculas de α -D-galactosa en la mitad polisacáridica del receptor (Figuras 47-D y 48-D). Esto implicaría que la asociación resultante entre un hongo liquenizado y un fotobionte que presente el receptor adecuado podría resultar en un talo diferente, representando un papel clave en líquenes tripartitos que se componen de un hongo con tanto un alga y una cianobacteria.

Aunque este reconocimiento cruzado pueda darse en condiciones experimentales, los resultados mostrados en la Figura 49 demuestran que la lectina homóloga desplaza eficazmente a la lectina heteróloga previamente unida al receptor de pared. En efecto, cuando la lectina de *Evernia* marcada con ITCF, se une al receptor de pared de *Nostoc*, la fluorescencia es rápidamente recuperada en el sobrenadante

(liberada de la pared celular) tras una segunda incubación de las mismas células con la lectina de *Peltigera* sin marcar con el fluoróforo (Figura 49-A) y lo mismo sucede cuando sobre células de *Trebouxia* se une previamente la lectina marcada de *Peltigera*: un gran porcentaje de esa fluorescencia es recuperada en el sobrenadante tras incubar las células con la lectina de *Evernia* sin marcar (Figura 49-B), estando de acuerdo con lo descrito por Molina y Vicente (1995) para el clorobionte de *X. parietina*. Esto quiere decir que, en ambos casos, la lectina homóloga muestra mayor afinidad por su receptor que la lectina heteróloga.

Para confirmar que una proteína poligalactosilada actuaba como receptor de la lectina en tanto en *Nostoc* como en *Trebouxia*, se incubaron ambas especies de fotobiontes conteniendo ureasa inducida con α -D-1,4-galactosidasa, según lo descrito por Sacristán y colaboradores (2006). Si la hidrolasa rompe el resto polisacárido del receptor de las lectinas, éstas no podrían unirse a la pared celular. Cuando se añaden, pues, las lectinas-ITCF a sus células homólogas o heterólogas después de ser tratadas con α -D-1,4-galactosidasa, se observa que un buen número de células de *Trebouxia* muestran la fluorescencia roja de las clorofilas tanto si han sido puestas en contacto con su lectina homóloga (Figura 50-B) como con la heteróloga (Figura 50-D). Lo mismo sucedió cuando el ensayo se repitió usando células de *Nostoc* con ureasa inducida (Figuras 50-F/G), aunque en este caso, parecía que el número de células que mantenían la fluorescencia del FITC unido a la proteína era menor cuando se usaba lectina de *Evernia* (alrededor de un 30 %) y mayor cuando la lectina procedía de *Peltigera* (cerca del 80 %), según se muestra en la Tabla III. Estos hechos podrían ser explicados a la luz de lo descrito por Max y Peveling (1983) y Fontaniella y colaboradores (2004) que demostraron que tanto los cianobiontes como los clorobiontes eran reactivos, “reconocibles”, frente a lectinas no líquénicas, como la concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis*, una leguminosa. Es decir, ese cierto grado de inespecificidad demostrado al encontrar el que receptor de pared para la lectina podía ser inducido, se ampliaba al encontrarse que lectinas de plantas superiores también podían unirse a un receptor de cloro y cianobiontes. ConA es una proteína que requiere la unión de Ca^{2+} y Mn^{2+} (Shoham *et al.*, 1979) para una correcta estereoquímica de sus dominios ligantes de azúcares, que en ese caso resultan ser α -D-glucosa y α -D-manosa. Secundariamente, ConA libre de su ligamiento a azúcares pero conteniendo Mn^{2+} unido, desarrolla actividad arginasa (Fontaniella *et al.*, 2004), al igual que las lectinas de líquenes. La posibilidad de que la ConA forme enlaces de afinidad con dos azúcares distintos radica en el hecho de que el dímero de ConA posee, en las cercanías del cluster Ca^{2+} - Mn^{2+} , dos diferentes dominios estereoreactivos, uno que liga glucosa formando puentes de hidrógeno con Glu27 y Lys229 y un segundo dominio que interacciona con

metil-manosa, formado por Lys99, Tyr100, Arg228 y Lys229 (Derewenda *et al.*, 1989). Aunque tanto la lectina de *Evernia* (Legaz *et al.*, 2004) como la de *Peltigera* (Díaz *et al.*, 2009) se puede decir que son indiscutiblemente arginasas, existen ciertas diferencias de masa molecular que podrían traducirse en diferencias funcionales.

En el clorolíquen *X. parietina*, una lectina fue parcialmente purificada y caracterizada por Bubrick y colaboradores (1985) como un polipéptido de bajo peso molecular de masa (12,5 kDa). Una forma polimérica de esta proteína se purificó (Molina *et al.*, 1997) y se encontró que tenía una masa molecular de 58 kDa pudiendo ser un posible pentámero. Una proteína similar se obtuvo para el cianolíquen *Nephroma laevigatum* (Kardish *et al.*, 1991) caracterizada como una proteína dimérica compuesta de dos monómeros diferentes de 52 y 55 kDa, de masa molecular semejante a la hipotética forma pentamérica. Otras lectinas de cianolíquenes han sido caracterizadas con masas moleculares de 20 o 33,7 kDa (Lehr *et al.*, 1995; Vivas *et al.*, 2010). Con una masa molecular de 20 kDa, las lectinas de *P. aphthosa* (Lehr *et al.*, 2000) eran capaces de unirse a células *Nostoc*, fotobiontes de *P. canina*, *P. horizontalis* y *P. polydactyla*, mientras que no se unía a células de vida libre de *Nostoc* o *Trebouxia*.

Como primera aproximación al estudio y caracterización de la lectina fúngica de *P. canina*, se realizó una pre-purificación mediante cromatografía de afinidad y posteriormente una electroforesis para determinar su peso molecular y/o de las posibles isoformas. Mientras que los monómeros de arginasa de *Evernia* tienen una masa molecular de unos 42 kDa y cuatro isoformas distintas (Pedrosa & Legaz, 1995), los monómeros de la arginasa de *Peltigera* tienen una masa molecular algo menor, (≈ 34 kDa) y dos isoformas distintas, según se observa en la Figura 51. Esta diferencia podría ser un reflejo de diferencias en la composición o disposición estérica de aminoácidos entre ambas lectinas, lo que justificaría que la lectina de *Evernia* sólo reconozca un receptor poligalactosilado mientras que la de *Peltigera* podría reconocer el mismo receptor y otros que contengan manosa, como puede deducirse de la reactividad de los fotobiontes a la ConA. En efecto, como se observa en la Figura 46-B, una parte de las células de *Nostoc* marcadas con su lectina-ITCF homóloga pueden recuperar su fluorescencia roja natural mediante incubación de las mismas con manosa 100 mM. La ConA no se une a galactosa, por lo que la analogía entre las arginasas líquénicas y lectinas específicas de galactosa deben buscarse en otras proteínas distintas, como las ricinas, lectinas producidas por *R. communis*. Las ricinas son lectinas diméricas con dos dominios diferentes para unirse a distintos hidroxilos del mismo azúcar. La ricina se une a galactosa usando Trp37 y Asp22 del dominio 1, estabilizado por una Gln 47, y Tyr248

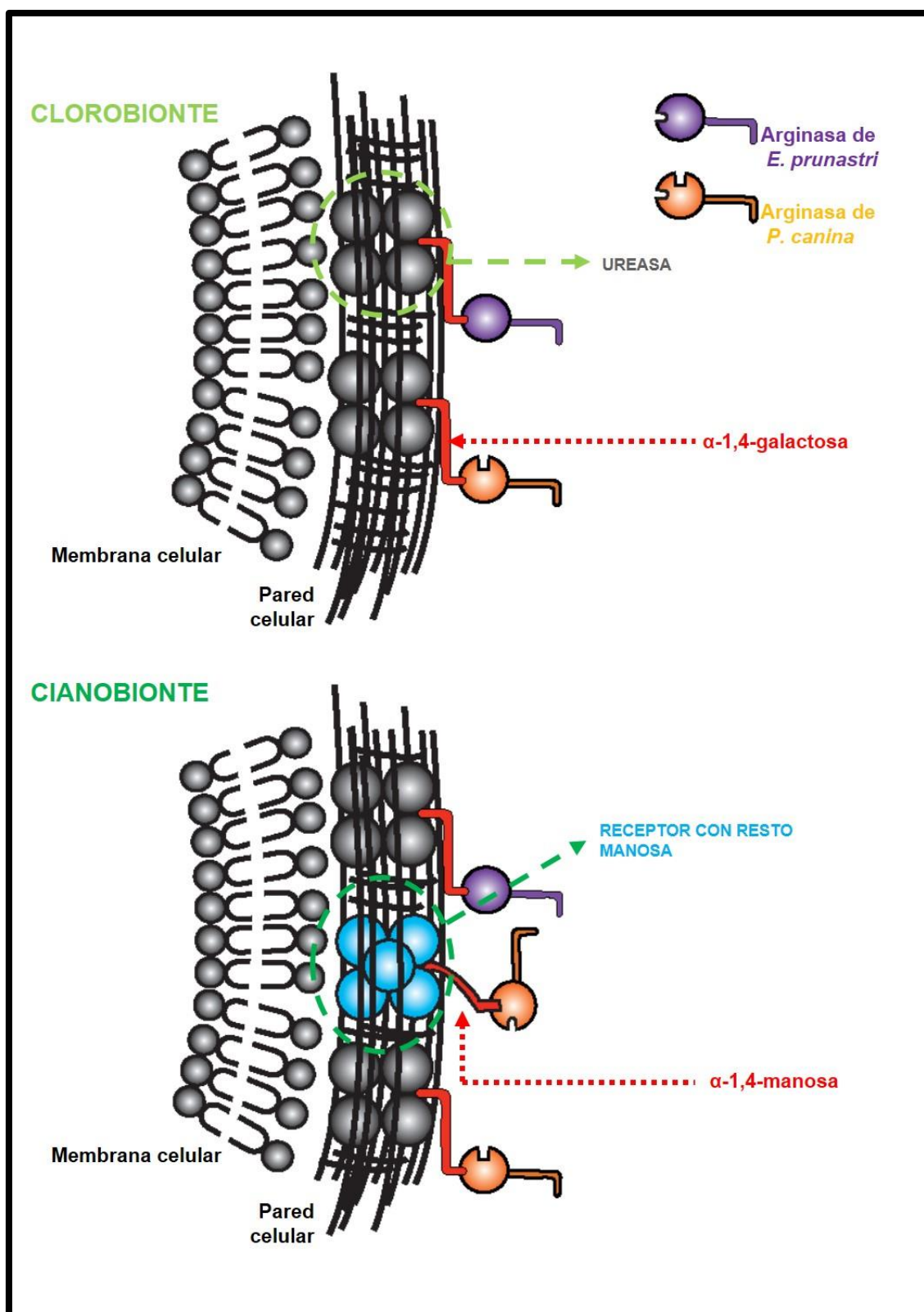


Figura 86. Reconocimiento de la lectina fúngica con actividad arginasa por parte del fotobionte compatible. (A) Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel celular del clorobionte de *E. prunastri*. (B) Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel celular del cianobionte de *P. canina*.

y Asp234 del dominio 2, estabilizado en este caso por Gln256 (Montfort *et al.*, 1987). La investigación de ambos dominios en las arginasas de líquenes debe ser el paso decisivo para explicar su actividad como proteínas de reconocimiento.

Mientras que los hongos formadores de líquenes son altamente especializados a niveles taxonómicos superiores (es decir, los órdenes de hongos a menudo se limitan a un solo género de fotobionte), los géneros de algas verdes del fotobionte son comúnmente asociados con linajes no relacionados de hongos (Rambold *et al.*, 1998; Piercey-Normore & DePriest, 2001). Parece deducirse de estos hechos experimentales la universalidad de un receptor único, ureasa poligalactosilada, capaz de unirse a lectinas presentes en el talo líquénico cuya especificidad es hacia el ligando más que hacia la especie de fotobionte.

Los mecanismos genéticos, en primer lugar el reconocimiento y la interacción, aún no han sido aclarados, aunque las proteínas de unión a los fotobiontes parecen estar implicados (Bubrick & Galun, 1980; Bubrick *et al.*, 1985; Honegger, 2001; Joneson & Lutzoni, 2009). Las lectinas aseguran la especificidad dentro del talo (Legaz *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2012), constituyendo unos de los procesos clave en el reconocimiento del potencial fotobionte, junto con el desarrollo de otros mecanismos celulares en orden de completar con éxito la compatibilidad (Rikkinen, 2002). Las etapas iniciales del desarrollo de los líquenes han sido el foco de numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Joneson & Lutzoni, 2009). Actualmente, el sistema *Cladonia grayi*-*Asterochloris* sp. está siendo utilizado como modelo para investigar los componentes genéticos involucrados en el desarrollo del líquen en las primeras etapas (Joneson *et al.*, 2011). Así mismo, las últimas investigaciones indican la importancia de exudados producidos por el fotobionte en las primeras etapas de pre-contacto (Meeßen *et al.*, 2013), donde el ribitol ejerce un fuerte efecto sobre el crecimiento del micobionte. En cualquier caso, las lectinas parecen también tener un papel fundamental en talos que contienen cianobiontes.

La falta de expresión del ligando de pared en el fotobionte de clorolíquenes lleva consigo una acumulación de poliaminas en el interior celular y una desorganización estructural del cloroplasto como consecuencia del acceso libre de arginasa a la célula. Sin embargo, la retención de la arginasa en la superficie de la pared celular de los fotobiontes, bloquea la súper producción de putrescina y minimiza los daños estructurales en algas compatibles. En el presente trabajo se ha pretendido abordar el estudio de los daños fisiológicos desencadenados por la incompatibilidad entre biontes, cuya principal consecuencia metabólica es el aumento de los niveles de putrescina (PUT), utilizando talos cianolíquenes de la especie *P. canina*.

A través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila se obtuvo información de la eficiencia fotoquímica de *Nostoc* (Figura 54). En plantas, las

moléculas de clorofila *a* asociadas a los fotosistemas I y II (PSI, PSII) son las responsables de la emisión de fluorescencia, siendo mínima la contribución del PSI en comparación al PSII a temperatura ambiente (González *et al.*, 2008). La adición de PUT, a bajas concentraciones o tiempos cortos de incubación, podría estar provocando en los talos de *P. canina* una alteración del fotosistema de modo que la eficiencia fotoquímica se ve favorecida, sin embargo, la presencia de PUT a concentraciones elevadas o tiempos largos de incubación, desencadenarían un proceso degradativo en el interior celular que desestabilizaría los fotosistemas. En un experimento realizado por Demetriou y colaboradores (2007) la adición de PUT en condiciones de estrés salino, aumentó el tamaño de los pigmentos antena del PSII responsables de los valores de Fv/Fm. Análisis realizados con muestras de *Physcia semipinnata* sometida a radiación UV, encontraron mayores contenidos de clorofila *a* así como una mayor actividad del PSII en las muestras a las que se añadió PUT de forma exógena (Unal *et al.*, 2008).

Al igual que las hormonas, las poliaminas están involucradas en una amplia gama de procesos fundamentales en las plantas, como la modulación de la actividad biológica o la estabilización de membrana (Galston *et al.*, 1997; Bais & Ravishankar, 2002). Las cargas positivas deslocalizadas de poliaminas, pueden proporcionar una fuerza electrostática que une proteínas cargadas y / o fosfolípidos y ácidos nucleicos, proporcionando rigidez a las membranas biológicas (Incharoensakdi *et al.*, 2010). Los peptidoglicanos bacterianos, esenciales para preservar la integridad celular y el crecimiento de la célula, son capaces de formar enlaces covalentes con poliaminas en especies como *Anaerovibrio lipolytica* (Hirao *et al.*, 2000). Del mismo modo ocurre en membranas tilacoidales de hojas de avena osmóticamente estresadas (Besford *et al.*, 1993). Así, los valores obtenidos para clorofila *a* extraída en presencia de PUT a bajas concentraciones tienden a estabilizarse, indicando una fijación de las membranas (Figura 55). Una característica exclusiva de las cianobacterias es que son los únicos organismos que poseen cadenas de transporte fotosintética y respiratoria situadas en el mismo compartimento, es decir, la célula procariota, y compartiendo algunos elementos comunes en dichas cadenas de transporte (Paumann *et al.*, 2005), tales como la plastoquinona o el complejo de citocromos b6f. Sin embargo, las cianobacterias han desarrollado un sistema de membranas interno capaz de separar espacialmente los procesos respiratorio y fotosintético. De este modo, las proteínas que intervienen en la cadena fotosintética de transporte de electrones se sitúan en el sistema de membranas intracitoplasmáticas, o membranas tilacoidales (ICM), mientras que las proteínas pertenecientes a la cadena respiratoria aparecen tanto en las membranas tilacoidales como en las membranas citoplasmáticas (CM) (Gantt, 1994). Cuando los valores de PUT son muy elevados a tiempos cortos (Figura 55) estabilizaría las membranas. Sin

embargo, a tiempos de incubación más elevados la putrescina desencadena procesos degradativos, como la activación de glucanasas, que llevan a la desestabilización de la membrana (Molina *et al.*, 1998; Molina & Vicente, 1995), favoreciendo entonces, la extracción de las clorofilas. Las diferencias encontradas entre tratamientos, deberían ser debidas a la incubación con putrescina y no por degradación de las clorofilas, ya que los coeficientes de feofitización (Tabla V) no variaban significativamente a lo largo del tiempo en ninguno de los casos analizados. En el caso del aumento encontrado para control podría ser debido al hecho de tener los talos sumergidos en agua, pudiendo esto, alterar la estabilidad de las membranas.

El oxígeno es esencial en el metabolismo de organismos aerobios. Sin embargo, factores de estrés como la luz ultravioleta o las temperaturas extremas, generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que reaccionan con proteínas, lípidos o pigmentos causando su degradación (Vavilin *et al.*, 1998). Un importante ejemplo del daño producido por las ROS es la peroxidación de la membrana lipídica. La peroxidación lipídica es detectada y cuantificada mediante las variaciones de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación (Pryor *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos parecen indicar una relación entre el contenido de MDA y PUT presente en el medio (Figura 56).

La inhibición de la peroxidación por poliaminas fue descrita por vez primera en sistemas animales. La unión de espermina a microsomas de hígado de rata produce una inhibición de la peroxidación lipídica por unión directa a fosfolípidos microsomales (Kitada *et al.*, 1979). Las poliaminas actúan como “carroñeros” de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estabilizan las membranas reduciendo la peroxidación lipídica producida bajo diferentes condiciones de estrés ambiental (Bouchereau *et al.*, 1999; Bellé *et al.*, 2004). La putrescina, actuaría como protector del contenido en clorofila a y el decaimiento de la peroxidación, favoreciendo la eficiencia fotosintética del fotobionte en líquenes de *P. canina*. Sin embargo, cuando las concentraciones son tan elevadas que el cianobionte no puede metabolizar, se desencadenan una serie de procesos degradativos que producirían una desestabilización de la membrana y con ello la disminución de la tasa fotosintética.

La actividad glucanasa de los cianobiontes de *P. canina* aumentó a las 2 h de tratamiento para luego disminuir fuertemente a partir de las 4 h, contrastando con los resultados obtenidos por Molina y colaboradores (1998) en clorolíquenes, donde fotobiontes de *X. parietina* suplementados con concentraciones variables de putrescina desde 1 mM a 10 mM, presentaron altos valores de actividad glucanasa después de las 3 h de incubación. Sin embargo, dichos valores se mantenían en el tiempo. Una

disminución de la actividad glucanasa podría estar relacionada con la síntesis de proteínas que inhiban dichas enzimas degradativas, responsables de la hidrólisis de las distintas capas de la pared celular del fotobionte. La degradación de las paredes celulares, es un mecanismo crucial para la nutrición e invasión de los patógenos de plantas. Para proteger la pared celular, las plantas secretan proteínas inhibidoras de glucósido hidrolasas (GHIPs) (Yoshizawa *et al.*, 2012).

Woo y colaboradores (2013), aislaron y caracterizaron en *Capsicum annuum*, *CaXEGIP1*, un gen que codifica un inhibidor de la enzima xiloglucano endo- β -1,4-glucanasa (XEG). Observaron que era rápidamente inducido en hojas de pimienta infectadas con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, así mismo, la proteína purificada CaXEGIP1 inhibió significativamente la actividad hidrolítica del glicósido xiloglucano endo- β -1,4- glucanasa en cepas de *Clostridium thermocellum*.

2. LA LECTINA FÚNGICA ACTUA COMO QUIMIOATRAYENTE MOVILIZANDO LOS FOTOBIONTES DE *P. CANINA*

Para determinar si las lectinas fúngicas producidas por *P. canina* eran capaces de reclutar fotobiontes actuando como un agente quimioattractante, se realizaron diversos ensayos de quimiotaxis de tipo cuantitativo y cualitativo. La entrada de cianobacterias en el interior de capilares que contenían arginasa liquénica fue positiva respecto al control y además se vio influenciada por el tiempo de incubación (Figura 58) y la concentración de la proteína (Figura 59). La respuesta móvil de *Nostoc* sp. siguió una distribución gaussiana, alcanzando un pico en tiempo y/o concentraciones intermedias para luego disminuir, siendo este comportamiento posiblemente producido por una sensibilización del receptor o de la cadena de señalización (Rubik & Koshland 1978). Parece deducirse que las lectinas de *P. canina* son capaces de atraer a diferentes tipos de cianobacterias en la suspensión de células correspondiente. De hecho, dicha glicoproteína con actividad arginasa, es capaz de reclutar células de algas (clorobiontes) y cianobacterias (cianobiontes) y formar enlaces de alta afinidad con diferentes unidades de galactosa (poli- α -1,4-galactósido) de la cadena lateral del receptor de lectina en la pared celular de las diferentes fotobiontes (Legaz *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2010). El desplazamiento de células *Nostoc* hacia una lectina, ha sido observado en otros organismos como las briofitas *Blasia pusilla* (Knight & Adams, 1996), *Leiosporoceros dussii* (Villareal & Renzaglia, 2006) o en angiospermas del género *Gunnera* (Nilsson *et al.*, 2006).

Las cianobacterias, ya sea unicelulares o filamentosas, muestran una respuesta a los cambios de la intensidad calidad espectral de la luz. Este hecho, queda demostrado a partir de las diferencias encontradas entre experimentos en luz y oscuridad (Figura 62), donde se observó una influencia de la luz en el movimiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica de *P. canina*. En un experimento realizado por Ohmori y Okamoto (2004) con *Anabaena cylindrica*, los niveles de AMPc mostraron diferencias en células incubadas en luz y oscuridad, sugiriendo que la actividad de la adenilato ciclasa podría ser estimulada. En *Synechocystis* 6803, la formación de colonias móviles ocurre en luz blanca, mientras que las células mutantes para el gen *cya1*, que codifica para la proteína adenilato ciclasa, pierden la motilidad (Terauchi & Ohmori, 1999). Modelos de movimiento realizados con cianobacterias filamentosas, determinaron la importancia de intensidad lumínica en la velocidad del movimiento así mismo, los resultados obtenidos sugirieron además, la importancia de la orientación y longitud de los filamentos para optimizar su desplazamiento (Tamulonis *et al.*, 2011).

La formación de asociaciones filamentosas de células de *Nostoc* sp. en el interior del capilar (Figura 60) contrastó con los fotobiontes no desplazados distribuidos de forma individual o en conjuntos de dos individuos. Este comportamiento nos muestra la creación de filamentos por parte del fotobionte como esencial para su desplazamiento, atraídos en este caso por un gradiente de lectina fúngica. De hecho, los hormogonios son agrupaciones celulares que no crecen, no fijan nitrógeno y regresan al estado de crecimiento vegetativo después de un período de cultivo en el laboratorio (Campbell & Meeks, 1989). La formación de hormogonios es un requisito previo para el establecimiento de la simbiosis en muchos hospedantes (Rai *et al.*, 2000). Se ha observado que la restricción de la movilidad de los hormogonios es una característica fenotípica que distingue a los miembros de los géneros formadores de heterocistes como *Nostoc* y *Anabaena*. *Nostoc* puede ser inducido para formar hormogonios por diferentes estímulos ambientales y por el denominado factor inductor de hormogonios (FIH) liberado de las plantas hospedantes con niveles bajos de nitrógeno (Adams *et al.*, 2006). Aproximadamente de 34 al 42 % de los 6.893 genes analizados en la especie *N. punctiforme* fueron transcritos durante la diferenciación de hormogonios, donde 1.034 genes respondieron en cuestión de 0,5 h después de la inducción con FIH, indicando los cambios globales extensos y rápidos en la transcripción de genes específicos durante la diferenciación de estos filamentos especializados (Campbell *et al.*, 2008).

La utilización de arginasa purificada a partir de *P. canina* y marcada con ITCF permitió estudiar la distribución del ligando de superficie en las células *Nostoc* durante los ensayos de quimioatracción (Figura 61). La emisión intensa y homogénea de la

fluorescencia verde de la superficie tanto en células desplazadas como en las que no, sugirió una unión uniforme del quimioatrayente a su receptor en la superficie de *Nostoc*. No obstante, en experimentos realizados con otros cianolíquenes como *L. corniculatum* (Vivas *et al.*, 2010) la lectina marcada se unía preferentemente a la superficie de algunas células *Nostoc* sp. en concreto a aquellas que ocupaban una posición terminal en el filamento. Cianobacterias como *P. uncinatum* parecen coordinar su desplazamiento mediante una polaridad en los tricomas (conjunto de células que conforman los filamentos), donde se establece una “cabeza” y una “cola” (Häder & Burkart, 1992).

Esto podría indicar que el hormogonio, responsable de la dispersión de las células *Nostoc*, está formado por las células que producen el receptor de lectina. Mientras que en los cianobiontes aislados de *Leptogium* aparecían siempre formando filamentos, las cianobacterias presentes en *P. canina* se mostraban de forma individual para luego reagruparse en filamentos que se desplazan hacia la lectina, indicando que todas las células podrían distribuirse a lo largo del filamento con indiferencia de su posición para *Peltigera*, no ocurriendo lo mismo en los cianobiontes de *Leptogium*. En cualquier caso, ambos fotobiontes desarrollaban actividad ureasa en sus paredes con el fin de ser reconocidos dentro del talo como socios compatibles (Sacristán *et al.*, 2006).

Durante la migración celular, la respuesta quimiotáctica provoca la formación de estructuras especializadas tales como filopodios, flagelos, fimbrias o cilios. No obstante, las micrográficas de microscopía electrónica de barrido obtenidas mostraron una total ausencia de dichos orgánulos aunque, nuevamente, se encontraron diferencias entre las células que se habían movido hacia el interior del capilar frente a las que no (Figura 63). El desplazamiento aquí encontrado podría ser catalogado como un quimiotropismo inducido por la lectina líquénica. Mientras que algunas las células no expuestas a la lectina estaban invaginadas, cuando entraron dentro del capilar recuperaron la forma y se asociaron formando la típica forma de filamentos de *Nostoc*, coincidiendo con las características de las células *Nostoc* que forman parte de los cianolíquenes, tales como: menor tamaño, vainas gelatinosas engrosadas, menos heterocistes, así como gránulos de cianofina (copolímeros de ácido aspártico y residuos de glutamina) (Chapman & Margulis, 1998).

Las micrográficas de microscopía electrónica de transmisión revelaron una compleja pared celular en los fotobiontes de *P. canina* (Figura 65) con una capa exterior de tipo irregular o serrada coincidiendo morfológicamente con la presente en otras cianobacterias (Adams *et al.*, 1999; Hoiczyk, 2000). El mecanismo de desplazamiento propio de cianobacterias filamentosas, que se mueven por planeo o *gliding*, es

actualmente desconocido (Risser & Meeks, 2013). Sin embargo, se ha asociado a proteínas segretadas y/o de la superficie celular (Castenholz, 1982; Hoiczyk & Baumeister 1998; Adams *et al.*, 1999; Duggan *et al.*, 2007). La superficie de *P. uncinatum* contiene fibrillas en la parte superior de la capa-S (Smarda *et al.*, 2002) denominadas oscilinas donde los filamentos que no expresaban esta glicoproteína pierden su capacidad de moverse. Estudios de homología sugieren que determinadas proteínas desempeñan papeles similares comparables en otras cianobacterias móviles (Hoiczyk & Baumeister, 1997). La cianobacteria marina *Synechococcus* WH8102 requería de la presencia las glicoproteínas SwmA (130 kDa) y SwmB (1,12 kDa) para desplazarse mediante un movimiento no flagelar (McCarren & Brahamsha 2007; 2009). Así mismo *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 parece utilizar una proteína extracelular, MrpC (15,5 kDa) para el contacto celular (Zilliges *et al.*, 2008). La diferencia entre pesos moleculares tan distintos puede ser debida a que en realidad son monómeros de proteínas cuaternarias, resultando estructuras finales similares, ya que la homología entre secuencias primarias podría estar indicando procesos de autoreconocimiento (Whitton, 2012).

En ausencia de fimbrias, el desplazamiento de los cianobiontes de *P. canina* hacia la lectina fúngica solo podría ser explicado por episodios sucesivos de contracción-relajación realizados por el citoesqueleto que, presumiblemente, requeriría la colaboración de actina y miosina (el llamado complejo acto-miosina) o proteínas similares. Algunas células de algas de vida libre, como *Porphyra pulchella* (Ackland *et al.*, 2007) emiten pseudópodos cuya fuerza para el deslizamiento es generada por actina y miosina. Un mecanismo por el que estas células generan tensión es a través de la vinculación de los filamentos de actina a sus proteínas de unión inmovilizadas en la pared celular, lo que hace que los filamentos de actina generen las fuerzas físicas requeridas para la motilidad celular (Higaki *et al.*, 2007). En células de mamíferos, la miosina II genera fuerzas de contracción a través de su actividad ATPasa dependiente de deslizamiento de los filamentos de actina, que es central en el control de la adhesión, la migración celular y la arquitectura del tejido (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). La miosina II también está implicada en varios tipos de movimientos morfogénicos en las células vegetales, tales como la polarización de los tubos de polen (Lenartowska & Michalska, 2008).

Sin embargo, la presencia de una cubierta mucilaginosa (Figura 63) en las células desplazadas así como el desplazamiento en ausencia de la lectina (Figura 58), podría estar indicando la existencia de otro tipo de mecanismo de movimiento multidireccional sin estímulo siendo posible que los fotobiontes utilicen ambos

mecanismos según sus necesidades, como ocurre en la bacteria *M. xanthus* (Zhang *et al.*, 2011). De hecho, la supresión de un solo gen, *hmpD*, en *Nostoc punctiforme* afecta a la formación de los hormogonios, la motilidad y la secreción de polisacáridos (Risser & Meeks, 2013). En cualquier caso el presente trabajo se ha centrado en el estudio del movimiento direccionado, presumiblemente mediado por el ensamblaje de polímeros.

3. LA QUIOTAXIS DE *NOSTOC* HACIA LA LECTINA FÚNGICA REQUIERE LA PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto de actina es el motor que impulsa la motilidad celular a través de una compleja cascada de transducción de señal. La maquinaria molecular básica que subyace en el montaje y desmontaje de los filamentos de actina se compone de una variedad de proteínas de unión a actina que regulan el comportamiento dinámico del citoesqueleto en respuesta a diferentes señales (Lambrechts *et al.*, 2004). Basándonos en la premisa de la participación del citoesqueleto en el desplazamiento de los cianobiontes de *P. canina*, la utilización de inhibidores del citoesqueleto impedirá o reducirá el movimiento de las células *Nostoc* hacia la lectina fúngica.

Las actinas pertenecen a una familia altamente conservada, donde todas las proteínas exhiben propiedades bioquímicas y funcionales comunes asociadas con la actividad de las proteínas contráctiles, tales como miosinas y numerosas proteínas reguladoras (Usmanova *et al.*, 1998). Para determinar la posible implicación del citoesqueleto bacteriano en el desplazamiento de cianobiontes de *P. canina* hacia la lectina fúngica, se utilizó el compuesto A-22. Este inhibidor afecta a la polimerización de MreB, actina bacteriana homóloga a la actina presente en eucariotas y tiene un efecto negativo tanto en la evolución en el tiempo como el grado de polimerización *in vitro* de MreB en presencia de ATP (Gitai *et al.*, 2005). Sorprendentemente, el número de cianobiontes desplazados hacia la lectina fúngica fue el mismo e incluso mayor en algunos tiempos que en aquellas células no incubadas con el inhibidor de actina bacteriana (Figura 66). Según estos resultados, la acción de A-22 sobre el desplazamiento de *Nostoc* parece inexistente. Así mismo, la distribución de los filamentos de actina o proteína homóloga visualizados con faloidina marcada, en los cianobiontes tratados con A-22 (Figura 67), sugiere de nuevo la ausencia de efecto por parte del inhibidor específico de actina bacteriana. Sin embargo, la asimetría y variedad de la fluorescencia encontrada, podría asociarse con la F y G-actina de eucariotas, cuya distribución está estrechamente relacionada con los modos de motilidad de diferentes células (Bugyi & Carlier, 2010; Lee *et al.*, 2013).

La ausencia de respuesta frente a un inhibidor específico de actina bacteriana, sugirió la posibilidad de que las estructuras implicadas en el movimiento de los cianobiontes de *P. canina* no fuesen filamentos de MreB, haciendo necesario un análisis más enfocado hacia la búsqueda de elementos homólogos del citoesqueleto eucariótico. Conforme con los resultados obtenidos, los experimentos realizados posteriormente se centraron en evaluar los efectos de compuestos que afectan a la dinámica y composición del citoesqueleto eucariótico con el fin de encontrar proteínas homólogas o cercanas en los fotobiontes de *P. canina*.

De hecho, concentraciones diferentes de blebistatina, inhibidor de la miosina II, provocaron un descenso en el número de células desplazadas al interior del capilar (Figura 68-A), sugiriendo que la vía de la miosina podría estar implicada en la quimiotaxis de las cianobacterias. Los tratamientos con faloidina parecieron seguir el mismo comportamiento (Figura 68-B) y curiosamente, la combinación de ambos dio lugar a una inhibición más aguda. La fuerza impulsora de la contracción, ha sido tradicionalmente atribuida a la actividad motora de la miosina (Huxley, 1973). Sin embargo, ciertas evidencias sugieren que la agrupación y reticulación de los filamentos del citoesqueleto también puede ser un mecanismo para la generación de estas fuerzas (Sun *et al.*, 2010). Células eucariotas primitivas como *Dictyostelium discoideum*, son capaces de desplazarse incluso cuando son deficientes en miosina (De Lozanne & Spudich, 1987). Del mismo modo, la inhibición de la miosina utilizando blebistatina disminuye moderadamente las velocidades de arrastre de queratocitos de pescado sobre sustratos planos (Keren *et al.*, 2009).

Una inhibición más acusada de la movilidad de los cianobiontes cuando combinamos ambos inhibidores (Figura 68-C), podría ser un indicio de que la fuerza de tracción proviene de la participación de los filamentos. La faloidina estaría bloqueando la despolimerización de los microfilamentos y por lo tanto impidiendo la locomoción celular mediada por actina. El efecto de la latrunculina-A y blebistatina en la inhibición del desplazamiento fue opuesto al encontrado en cianobacterias incubadas en presencia de blebistatina y faloidina. La acción de latrunculina-A causa alteraciones en la estructura de G-actina que impiden su participación en la polimerización (Morton *et al.*, 2000) e inhibe la quimiotaxis hacia la lectina de hongos en un 44 % (Díaz *et al.*, 2011). A partir de estos hechos experimentales se podría deducir dos cosas: la polimerización transitoria es necesaria para el quimiotropismo de la célula, pero la conexión miosina con actina estaría alejada con respecto a la zona donde se produce el mecanismo de despolimerización-repolimerización durante el desplazamiento celular.

Basándonos en que la faloidina se une a la actina filamentosa (actina-F) con alta afinidad e impide su despolarización, pero a diferencia de anticuerpos, no se une actina globular monomérica (actina-G), el análisis sobre las posibles redes de actina presentes en los cianobiontes de *P. canina* fue realizado.

Cuando las células se movilizaron hacia la léctina fúngica y posteriormente marcadas con faloidina-ITCF, mostraron asimetría en la tinción y en algunos casos no coloreadas, revelando puntos de probable despolimerización de F-actina por una ausencia de fluorescencia detectada en esa zona (Figura 70). Sin embargo, los cianobiontes tratados con el inhibidor blebistatina y/o combinado con faloidina, presentaron un número menor de células asimétricas (Tabla VI). La falta de asimetría, estaría relacionada con la presencia/ausencia de actina polimerizada. La tinción específica en zonas concretas del interior celular de los cianobiontes, podría interpretarse como el resultado de la unión de la faloidina marcada con actina-F, mientras que las zonas no coloreadas presentarían un valor más elevado de actina no polimerizada o actina-G. La disminución de la asimetría en aquellos tratamientos en los que se introdujo inhibidores del citoesqueleto revelaría de nuevo, un mecanismo de despolimerización-repolimerización durante el desplazamiento celular, donde la organización de los filamentos de actina juega un papel importante en el movimiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica.

Experimentos realizados por Zheng y colaboradores (2013) con cianobiontes de la especie *Azolla microphylla* utilizaron faloidina marcada para determinar la distribución del citoesqueleto, mostrando fluorescencia tanto en células vegetativas como heterocistes. Sin embargo, aquellas con indicios de apoptosis celular, carecían de una distribución organizada de actina y exhibieron una fluorescencia más débil.

La intensidad del marcaje con faloidina-ITCF es proporcional a la cantidad de filamentos de actina-F en la muestra a analizar. Basándonos en esta relación, se cuantificó la fluorescencia emitida mediante la visualización de micrografías obtenidas por microscopía confocal. El tratamiento previo con faloidina no marcada mostró los valores más elevados (Figura 72) coincidiendo con lo esperado. Un estabilizador de los filamentos como la faloidina generará estructuras rígidas que impedirán el movimiento celular basado en el citoesqueleto. Sin embargo, un mayor número de filamentos afectará de forma positiva al marcaje con faloidina marcada. Aquellos fotobiontes que fueron tratados con blebistatina, presentaron una fluorescencia media menor con respecto al control. En principio, la blebistatina estaría afectando a la miosina o proteína homóloga presente en los cianobiontes por lo que los valores analizados deberían ser

próximos a los de las células no tratadas con inhibidores. Sin embargo, diferentes experimentos realizados con fibroblastos humanos dando como resultado que la blebistatina también afecta a la polimerización de los filamentos disminuyéndola (Hirata *et al.*, 2008), pudiendo ser esta la explicación de la bajada de fluorescencia en las células tratadas con blebistatina y blebistatina más faloidina de forma conjunta.

En el caso del inhibidor A-22, los datos podrían interpretarse como una interacción entre este inhibidor específico de la polimerización MreB y la actina o proteína homóloga presente en los cianobiontes de *P. canina* ya que fluorescencia tanto máxima, mínima como media fue la menor de todas las analizadas. No obstante, los experimentos de quimioatracción realizados no mostraron una inhibición del número de células en el interior del capilar. Gaballah y colaboradores (2011) observaron que A-22 no afectaba a la polimerización de MreB en la bacteria *Chlamydomonas pneumonia*. MreB unido a A-22 es capaz de polimerizar pero genera filamentos de actina-ADP mucho más inestables que los de actina-ATP y con una tasa de polimerización más lenta (Bean *et al.*, 2009). Los filamentos formados en *Nostoc* podrían presentar una conformación ligeramente diferente a los formados en ausencia de A-22 que no impediría el movimiento celular pero si el marcaje con faloidina. De hecho, experimentos realizados con cianobacterias del género *Anabaena* sp. cepa PCC 7120, indicaron que A-22 podía inhibir el crecimiento celular, causar anomalías en la morfología celular e incluso una distribución irregular de ADN. Sin embargo, tenía muy poco efecto sobre la formación heterocistes lo que llevo a pensar que puede tener otras dianas celulares en las bacterias (Wu *et al.*, 2011).

Esto evidenciaría la existencia de un mecanismo de movimiento que se ve afectado por inhibidores específicos del citoesqueleto eucariótico, aun siendo este un organismo clasificado dentro del Reino Bacteria (Cavalier-Smith, 2002). El posible modelo de movimiento se podría dividir en cuatro fases (Figura 87):

- La célula no estimulada permanece en su forma esférica.
- El micobionte induce quimioatracción sobre el cianobionte mediante la producción de lectinas que segregada al medio. Estas proteínas son reconocidas por el receptor de pared, lo cual activaría una ruta de señalización en el interior de la célula que desencadena la reorganización del citoesqueleto. La contracción de la miosina arrastrará el domino de unión con la F-actina, produciendo una retracción de la zona en el interior del cuerpo celular.
- Esto debe ser seguido de una despolimerización de las actinas en el polo opuesto, disponibles para incorporarse de nuevo en el extremo anterior.

- Después de llevarse a cabo el movimiento se produciría la repolimerización, con lo que se consigue recuperar la forma esférica inicial, siendo este paso acompañado de un posible reclutamiento celular.

No obstante, todos estos resultados sugirieron la necesidad de utilizar técnicas analíticas inmunoquímicas que nos permitieron detectar de una forma directa la existencia de las proteínas que participan de forma activa en el movimiento de los cianobiontes de *P. canina*.

4. LOS CIANOBIONTES *NOSTOC* DE *P. CANINA* PRESENTAN UN CITOESQUELETO DE ACTINA Y MIOSINA-II

La β actina es la principal isoforma de las actinas citoplasmáticas y está expresada en la mayoría de las células eucarióticas no musculares, así como en mioblastos indiferenciados. Sin embargo, las isoformas α actinas son más específicas y están funcionalmente envueltas en la contracción (Nudel *et al.*, 1983; Small & Gimona, 1998). Una respuesta antígeno-anticuerpo positiva para los anticuerpos anti- β -actina (Sigma A2228) y anti- α -actina (Abcam, ab 40863) reveló la presencia de una proteína de masa molecular de 50-55 kDa (Figura 73), más pesada que la de actinas convencionales (42 kDa) y mucho más que la actina homóloga bacteriana MreB (37 kDa). Del mismo modo ocurría con la actina encontrada en otras cianobacterias como *S. platensis*, con un peso molecular entre 45 y 56 kDa (Usmanova *et al.*, 1998), sugiriendo esto inserciones en la secuencia primaria y /o modificaciones post-transduccionales que modifiquen el peso final. En cepas de la especie *Nostoc* sp. PCC 73102 el análisis proteico por espectrometría de masas reveló la existencia de una hipotética proteína Sp39 en la fracción soluble con una homología del 92% de similitud con una ATPasa dependiente de actina de *Anabaena variabilis* lo que sugiere un papel en la morfogénesis de *Nostoc* (Ran *et al.*, 2007).

La electroforesis bidimensional reveló un pI para la actina de los cianobiotnes de *P. canina* entre 4 y 7 (Figura 74), en un rango de valores en los que se encuentran las distintas isoformas de la actina eucariótica con un punto isoeléctrico que varía entre 5,4 y 5,9 (Zechel & Weber, 1978). *In vivo*, las diferentes isoformas pueden coexistir en la misma célula pero están diferencialmente reguladas, y en la mayoría de los casos no pueden sustituirse entre sí funcionalmente (Kumar *et al.*, 1997; Chaponnier *et al.*, 1995). La actina es la proteína más abundante en muchas células eucariotas, y se conservado desde las levaduras hasta los humanos (Schmidt & Hall, 1998).

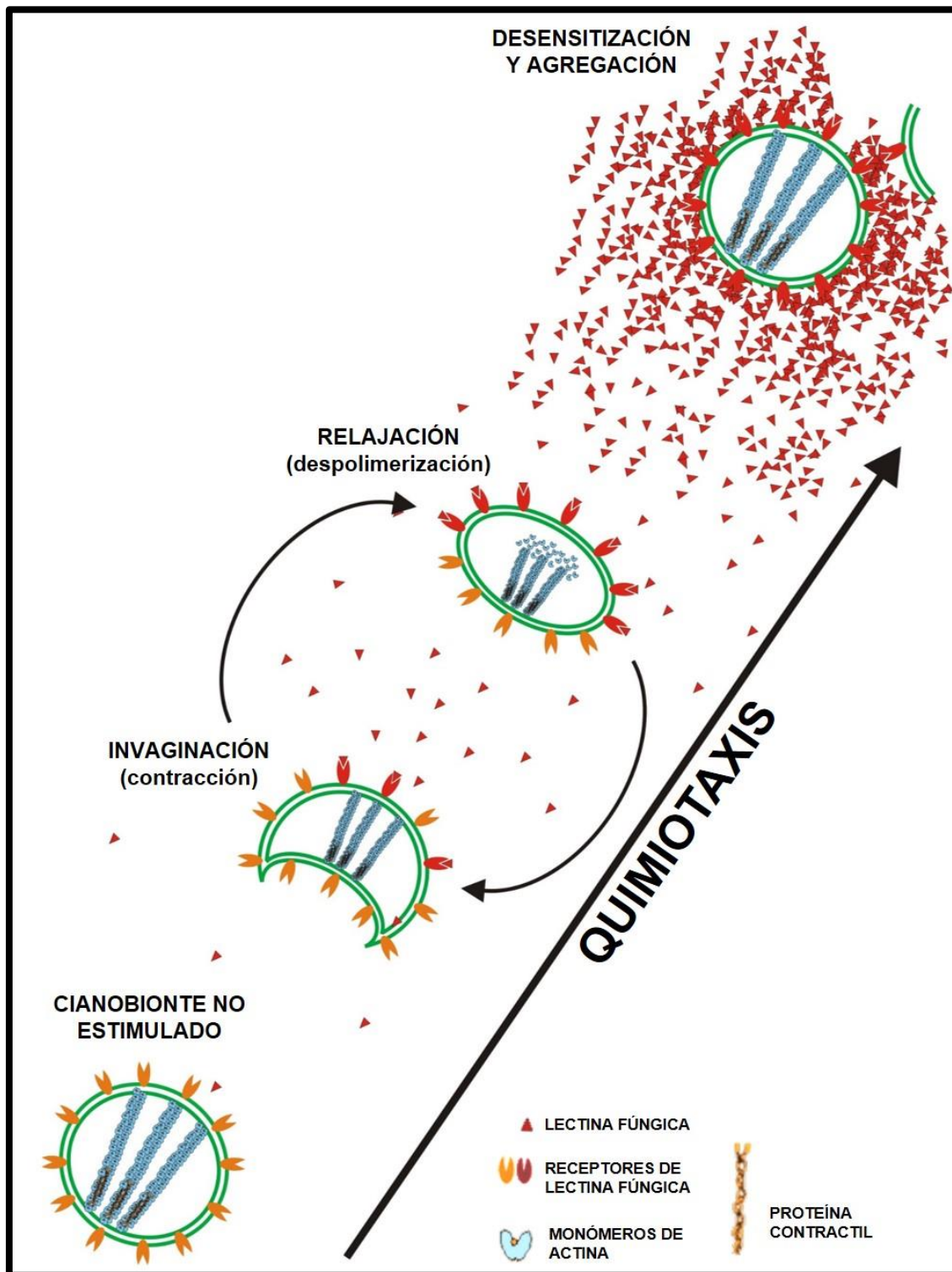


Figura 87. Esquema teórico del movimiento de los cianobiontes de *P. canina* hacia un gradiente de lectina fúngica. La primera unión de la lectina a sus receptores de pared induce la invaginación polarizada de las células, producido por la interacción de una ATPasa con capacidad contráctil, sensible a blebistatina, con F-actina del citoesqueleto. A continuación, la despolimerización de actina-F en el polo opuesto y la consiguiente re-polimerización produce el avance de las células.

En plantas, la actina es una proteína esencial y se expresa en forma de distintos isotopos. Mientras que las algas verdes contienen uno o dos genes que codifican para actina, el número de genes de actina aumenta considerablemente en las plantas

terrestres (Šljajčeroová, *et al.*, 2002). En la cianobacteria *M. aeruginosa* se ha encontrado una proteína, denominada como ActM, cuya secuencia es un 65 % homóloga a la de la actina eucariota, la cual parece haber adoptado una función estructural ya que se ha localizado hacia la periferia de la célula. Se cree que las numerosas interacciones de las proteínas de unión a actina (ABP) con la propia actina son responsables de la limitación de evolución de su secuencia, por lo que es una de las proteínas más conservadas (Erickson, 2007), aunque hasta la fecha, los homólogos de las ABP de eucariotas no se han identificado en bacterias (Guljamow *et al.*, 2012).

El anticuerpo anti- β -actina unido a ferritina fue utilizado para la localización celular de la actina en los cianobiontes mediante micrografías electrónicas de transmisión. La inmunoreacción fue de nuevo positiva (Figura 75), los antígenos celulares mostraron un patrón de distribución fibrilar en el interior de los cianobiontes, lo que podría interpretarse como filamentos de actina. Las fibras del citoesqueleto formarían una malla que se extiende por todo el citoplasma hasta la membrana celular. La presencia de gránulos en las cercanías de la membrana, podría ser interpretada como la zona de anclaje de los filamentos. La naturaleza de las proteínas de anclaje en las cianobacterias no está clara en la actualidad. Sin embargo, la importancia del citoesqueleto de anclaje a través de moléculas de adhesión en la regulación de los archivos adjuntos celulares está bien establecida (Sastry & Burridge, 2000). La asociación de filamentos de actina a la membrana plasmática proporciona estabilidad mecánica, mantiene la forma celular y la adhesión y regula dinámicos salientes superficiales, tales como lamelipodios o filopodios, factores determinantes de la motilidad y el potencial migratorio (Sastry & Burridge, 2000). La disminución y en algunos casos ausencia de marcaje en el interior celular cuando los cianobiontes fueron incubados en presencia de latrunculina-A (toxina que impide la polimerización de los filamentos), podría interpretarse como una unión específica por parte del anticuerpo a actina-F polimerizada.

En paralelo, se observó una forma polarizada en las células incubadas con la lectina con respecto a las células control. Cabe pensar que la respuesta a una señal externa producida por la arginasa fúngica, desencadenaría una cascada de señalización que active la maquinaria necesaria para desarrollar un cambio conformacional a nivel celular (Orchard *et al.*, 2012), produciendo finalmente el movimiento del fotobionte. La desaparición de la forma polarizada en los cianobiontes incubados con latrunculina-A, podría estar indicando que el citoesqueleto tiene que ver con ese cambio conformacional, de acuerdo con la hipótesis formulada para el movimiento de los cianobiontes hacia la lectina fúngica.

Las imágenes de microscopía confocal (Figura 77, 78 y 79) permitieron analizar la distribución de la actina en el interior de los cianobiontes. Las células en contacto con la arginasa mostraron una distribución localizada de la actina polimerizada donde la distribución se mantenía a lo largo de las capas analizadas respecto a los cianobiontes control. Se demuestra nuevamente que la organización del citoesqueleto se ve alterada en presencia de la lectina fúngica ya que la faloidina únicamente permite determinar la posición de la actina-F. La utilización de latrunculina-A, disminuyó la emisión de la fluorescencia en las células analizadas y a lo largo del eje Z de todas ellas, un resultado que sólo puede asociarse a un aumento de los monómeros de actina ya que la utilización de este inhibidor mantiene la actina despolimerizada en células vivas (Yarmola *et al.*, 2000) y como consecuencia, la faloidina marcada no encontrará filamentos estables a los que unirse.

A juzgar por estos resultados se podría decir que la existencia de una proteína homóloga a actina en cianobiontes de *P. canina* ha sido demostrada por vez primera. La especificidad de la reactividad antigénica fue apoyada por el hecho de que anticuerpos determinados de actina reconocen de forma específica isoformas distintas con pesos ligeramente diferentes (Figura 74). La presencia de una proteína homóloga a actina, con propiedades específicas de las actinas eucariotas ha sido descrita con anterioridad (Labbe *et al.*, 1996; Guerrero-Barrera *et al.*, 1996; Labbe *et al.*, 1998). Sin embargo nunca antes fue descrita en un cianobionte de líquen, tomando solidez la hipótesis propuesta para el desplazamiento de las células *Nostoc* en el interior del talo liquénico. El paso siguiente sería la determinación de la secuencia de la denominada actina homóloga por espectrometría de masas con el fin de poder caracterizar y entender en mayor profundidad el mecanismo por el cual la proteína actúa *in vivo*. Un problema fundamental es la falta de secuencias de actina o proteínas homólogas de cianobiontes en general, o de *Nostoc* en particular, en las principales bases de datos públicas de secuencias existentes hasta la fecha.

La movilidad celular asociada al citoesqueleto requiere la participación de actina y proteínas asociadas como la miosina (Usmanova *et al.*, 1998; Hodges *et al.*, 2011). Por tanto, la presencia de actina requeriría presumiblemente la actuación de proteínas motoras, que se asocian a ella para producir movimiento. A este respecto, es interesante observar que la actina de las cianobacterias es capaz de unirse y activar una proteína ATP-dependiente (Labbe *et al.*, 1996; Labbe *et al.*, 1998).

Los experimentos de inmunodetección revelaron la presencia de una proteína con una movilidad electroforética muy parecida a las cadenas pesadas y ligeras de la

miosina II propias de organismos eucariotas (Figura 80 y 81). De igual modo que ocurría con la detección de proteínas homólogas de actina, la detección positiva con anticuerpos específicos de miosina de los organismos llamados tradicionalmente como superiores, confirma la existencia de una proteína homóloga a la miosina en el interior de los cianobiontes de *P. canina*. En el caso de las cadenas pesadas, la banda mayoritaria coincidió con la del organismo eucariótico control. Sin embargo, las cadenas ligeras revelaron 2 bandas, una de 20 y otra de 48 kDa. Las cadenas ligeras de miosina II suelen presentar un peso entre 18-20 kDa por lo que la presencia de una banda de un peso aproximadamente al doble del conocido para estas proteínas podría deberse a varias razones:

- que sea un dímero no disociado en monómeros debido a que la cantidad de agente reductor utilizado (β -mercaptoetanol) no sea suficiente.
- que sea un dímero y los enlaces que lo conforman no sean de puentes disulfuro.
- que la banda reconocida por el anticuerpo no tenga relación con la cadena ligera de miosina.

De las tres opciones posibles la primera parece la más probable aunque, con los experimentos realizados no podemos saber con exactitud los enlaces que establecen la conformación cuaternaria de esta proteína considerada como homóloga de miosina. La inmunodetección con diferentes anticuerpos de diferentes casas comerciales descartaría la unión inespecífica, lo cual se verificaría con los experimentos discutidos a continuación.

La actividad de la miosina MIIIB está regulada por la fosforilación de residuos Thr18 y / o Ser19 en su cadena ligera reguladora (RLC). La fosforilación simultánea en ambos residuos promueve máxima actividad ATPasa de la miosina y la formación de grandes haces de actina (Ikebe & Hartshorne 1985; Vicente-Manzanares *et al.*, 2009; Vicente-Manzanares *et al.*, 2010). Basándonos en esta premisa, la proteína homóloga a la miosina encontrada, debería fosforilarse-desfosforilarse durante el desplazamiento mediado por el citoesqueleto en los cianobiontes de *P. canina*. Como se muestra en la figura 82, el marcaje con el anticuerpo específico de miosina fosforilada de las cianobacterias en contacto con la lectina fúngica a diferentes tiempos de incubación, mostró diferencias según el tratamiento. De esto se deduce un cambio conformacional de la proteína homóloga a la miosina asociado a la interacción con la lectina fúngica con las células *Nostoc*, el cual variará a lo largo del tiempo. Las miosinas conforman una familia tremendamente diversa de proteínas dependientes de ATP que interaccionan con la actina. Todas comparten un dominio homólogo que contiene la

ATPasa, mientras combinaciones particulares de dominios adicionales definen las diversas "clases" o "tipos". Las miosinas se encuentran presentes en la mayoría de eucariotas estudiados, lo que sugiere una evolución similar a la de la propia actina. La miosina II es un grupo bien definido filogenéticamente al que pertenecen sobre todo miosinas que proporcionan la fuerza física para la contracción muscular en animales. Más allá de estas funciones cruciales en células del músculo animal, una amplia gama de miosinas no musculares está documentada (Dayraud *et al.*, 2012). La miosina II está, por ejemplo, implicadas en la motilidad ameboide de la etapa de la vida unicelular de *D. discoideum* (Meili *et al.*, 2010). Aunque no hay un homólogo de las cabezas de las miosinas identificado en procariotas, los dominios motores de las miosinas se relacionan con la superfamilia de las NTPasas (incluyendo ATPasas y GTPasas) las cuáles si están presentes en los procariotas (Kull *et al.*, 1998; Leipe *et al.*, 2002).

Todos estos resultados apoyan la idea del modelo de movimiento asociado al citoesqueleto. La presencia de una proteína, llamémosla actina, capaz de ser reconocida por diferentes anticuerpos específicos de epítomos de actina, así como la presencia de motores moleculares reconocidos por anticuerpos determinados para la miosina II que son fosforilados en su cadena ligera queda aquí demostrado.

5. RESUMEN DEL SISTEMA DE REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD EN LOS CIANOBIOTES DE *P. CANINA*

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la participación de la lectina fúngica como molécula señal capaz de activar el mecanismo de reorganización del citoesqueleto en los cianobiontes de *P. canina*. Sin embargo, para regular su plasticidad, el citoesqueleto está bajo estrictos mecanismos de control (Mounier *et al.*, 1999). Basándonos en las rutas de señalización moduladas por GTPasas, podemos elucubrar sobre la posible vía de transducción de señal, según los datos obtenidos en los experimentos con nucleótidos (Figura 85).

Amplios estudios de la dinámica del citoesqueleto han establecido firmemente que Rho, Rac y Cdc42 (miembros prototípicos de la familia Rho) controlan distintas vías de señalización morfogénicas, cruciales para la adhesión celular y/o la motilidad (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Sin embargo, inhibidores de la miosina II como la blebistatina, inducen la activación de Rac y Cdc42 en múltiples tipos de células (Katsumi *et al.*, 2002; Loudon *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2006; Even-Ram *et al.*, 2007; Vicente-Manzanares *et al.*, 2007). El tratamiento con blebistatina y faloidina provocó una

reducción del número de cianobiontes atraídos hacia la lectina fúngica, mientras que la presencia de AMPc y/o GTP e inhibidores del citoesqueleto conllevó a un aumento del desplazamiento celular hasta un 80 % respecto al control (Figura 84 y 85).

Existen señales ascendentes, a menudo derivadas de ligandos extracelulares, que activan factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que catalizan la eliminación de GDP, permitiendo la presencia de GTP y con ello la activación de las GTPasas como las proteínas Rho. Unidas a GTP, las proteínas Rho interactúan con los efectores específicos, es decir, proteínas de señalización o estructurales que median sus efectos celulares (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Sin embargo, las proteínas de la familia GEFs son catalíticamente inactivas cuando se encuentran formando complejos con la miosina (Lee *et al.*, 2010), por lo que la presencia de blebistatina favorece la liberación de los GEFs activadores en este caso de las GTPasas Rac y Cdc42. En presencia de blebistatina, la ruta derivada de la activación de estas GTPasas debe encontrarse activa impidiendo que la miosina se fosforile, como consecuencia de ello, la quimiotaxis es inhibida (Figura 84 y 85).

Cantidades exógenas de AMPc, estimularon el movimiento en los cianobiontes de *P. canina* (Figura 84) como en las cianobacterias *S. platensis* y *Synechocystis* 6803 (Ohmori *et al.*, 1993; Terauchi & Ohmori, 1999). Sin embargo, estas células estaban incubadas a su vez con blebistatina y faloidina así que, siguiendo en la línea de la ruta propuesta, este nucleótido debería estar activando algún elemento de la ruta que active el mecanismo de organización del citoesqueleto. La importancia de la cascada de señalización del AMPc y su mecanismo de regulación en respuesta a los cambios en el ambiente externo se ha puesto de relieve en especies como *S. platensis* NIES-39 (Fujisawa *et al.*, 2010) ya que el AMPc es una importante molécula de señalización en cianobacterias (Ohmori & Okamoto, 2004).

Una de las funciones del AMPc en eucariotas, es la regulación de las proteínas quinasa dependientes de AMPc (PKA) (Silvio Naviglio *et al.*, 2009). Las proteínas serina/treonina quinasas han sido asociadas principalmente con la señalización en las células eucariotas. Sin embargo, el genoma de *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 contiene genes que codifican proteínas serina/treonina quinasas, asociadas con el movimiento celular (Panichkin *et al.*, 2006), que muestran similitudes con las proteínas quinasas de tipo eucariota típicas (Kaneko *et al.*, 1996). Entre ellas *sll1575* es el único que codifica la parte C-terminal conservada de la proteína quinasa denominada SpkA. La búsqueda de homologías en la base de datos de proteínas reveló que es un miembro de la familia Pkn2 en bacterias, perteneciente a la superfamilia de proteínas

serina/treonina quinasas de eucariotas. El gen *spka* que codifica también estas quinasas, aunque no se ha encontrado un homólogo eucariótico hasta la fecha, existen homólogos en cianobacterias como *Anabaena* sp. cepa PCC 7120 y *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Kamei *et al.*, 2001; Zorina, 2013). Proteínas homólogas de SpkA como SpkB, participan en la motilidad celular cianobacteriana y son capaces de modificar los principales sustratos de las proteínas quinasas de eucariotas, sin embargo, sus funciones directas son desconocidas (Zorina, 2013).

La utilización de GTP junto a la blebistatina debería intensificar el efecto de esta ruta, provocando una entrada aún menor en el capilar. Sin embargo, el efecto es observado justamente el contrario, a medida que aumentaba la concentración de GTP, el número de células en el interior capilar es mayor. Esto podría estar implicando una hiperactivación de Rac/Cdc42 lo que daría a una inactivación de la ruta, favoreciendo la fosforilación de la miosina y la posibilidad de movimiento por parte de las cianobacterias mediante la activación de Rho o proteínas similares con la misma función. De hecho, el antagonismo fenotípico que existe entre Rac y Rho, refleja su activación en diversos tipos de células, donde los niveles de Rac activa se correlacionan inversamente a los niveles de Rho activa (Sander *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2001). Los trabajos realizados por Mounier y colaboradores (1999) concernientes a la motilidad de *Shigella flexneri*, una bacteria invasiva patógena, demostraron que el desplazamiento de esta procariota estaba controlado por las GTPasas Cdc42, Rac y Rho, donde el movimiento inducía la polimerización localizada de los filamentos de actina en un polo de la bacteria.

La faloidina es un conocido estabilizador de los filamentos de actina (Spector *et al.*, 1999) que se une a los monómeros de actina evitando la despolimerización mientras la polimerización continua. Sin embargo, la zona de mayor afinidad entre la miosina y actina donde se produce una conversión de la energía química del ATP en energía mecánica, no se ve afectada por el efecto estabilizador de la toxina (Dancker *et al.*, 1975). Con independencia de las GTPasas activadas, la faloidina estará impidiendo la despolimerización de la actina y con ello se verá afectado el movimiento. De hecho, los experimentos de quimiotaxis en los que se utilizó faloidina (Figura 68), demostraron que el número de células en el interior de capilar disminuía a medida que aumentaba la concentración del inhibidor. No obstante, en todos los casos analizados (Figura 84 y 85) la motilidad era recuperada en mayor o menor grado. Esto podría deberse a que la adición de los nucleótidos podría estar activando un mecanismo de eliminación o desplazamiento de la faloidina y por lo tanto la tasa de reciclado de los monómeros de actina volvería a los niveles normales de la célula, lo que permitiría la recuperación de

la motilidad. Existen proteínas de unión a actina (ABP-actin binding protein) capaces de desplazar a la faloidina, como es el caso de la gelsolina (Allen & Janmey, 1994), perteneciente a la superfamilia de la vinila, la gelsolina modula el ensamblaje de los filamentos de actina en bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* (Roney *et al.*, 1998).

Los valores obtenidos para los cianobiontes incubados con GTP exclusivamente, coinciden con la hipótesis propuesta (Figura 85). Los GEFs para Rac/Ccd42 están unidos a la miosina II y por tanto no activos. El GTP activaría la ruta de Rho de reorganización del citoesqueleto. Rho kinasa activa, inhibe a la MLC fosfatasa impidiendo que ejerza su acción sobre la miosina. Ésta queda fosforilada y activa, lo cual es favorable para el movimiento. La activación de Rho kinasa también activa LIM kinasa, que inhibe a la cofilina impidiendo la despolimerización de los filamentos de actina. Es decir, el GTP trataría de favorecer el movimiento de las células. Sin embargo, debido a que el número de células no es superior al control, cabe pensar de nuevo en una hiperactivación, en este caso de Rho.

Estudios en *S. cerevisiae* han demostrado que el estrés de la pared celular induce una despolarización transitoria del citoesqueleto de actina, posiblemente como un mecanismo para reparar los daños de la pared celular en general. La despolarización se produce por la hiperactivación de Rho1, lo que sugiere que Rho1 puede funcionar como un reostato en lugar de un interruptor de encendido-apagado simple (Delley & Hall, 1999). Actualmente se desconoce si (y cómo) los mecanismos de Rho-dependientes se conservan en todo el reino bacteriano. Rho está presente en más del 90 % de los genomas bacterianos secuenciados, aunque en cianobacterias, mollicutes y una fracción de firmicutes la proteína Rho se encuentra ausente hasta el momento (D'Heygère *et al.*, 2013). No obstante, se han encontrado proteínas que presentan secuencias similares a las GTasas de la familia Ras con similitud de secuencia con GTPasas, denominadas como MglA, que desempeñan un papel regulador en el control de la expresión o actividad del desplazamiento tipo *gliding* (Nan & Zusman, 2012).

La presencia de análogos del GTP como GTP γ (s) y GDP β (s), junto a los inhibidores de la funcionalidad del citoesqueleto blebistatina y faloidina, tuvieron una repercusión mayor que el propio GTP, produciendo un aumento del número de cianobiontes hasta un 90 % con GDP β (s), e incluso superando el valor obtenido en control para los tratamientos con GTP γ (s) (Figura 85).

La molécula GTP γ (s) se caracteriza por la presencia de un átomo de azufre en el grupo fosfato- γ haciendo que la estructura no sea hidrolizable en esta posición, de este modo se convierte en un análogo del GTP resistente a la actividad GTPasa de las proteínas G lo que proporciona a la célula un sistema de retención cinética de la duración de la señal (Hill *et al.*, 2001). GTP γ (s) reemplazaría al GTP endógeno para formar complejos GTP γ (s)-GTPasa siempre activos. La presencia de blebistatina de nuevo, favorecería la liberación de los GEFs activadores de las GTPasas Rac y Cdc42, inhibiendo la activación de MLC kinasa, responsable de la fosforilación de la miosina y por lo tanto impidiendo el movimiento. Sin embargo, los datos obtenidos sugieren la activación de las quinasa que fosforila la cadena ligera de la miosina II (Figura 85) permitiendo el movimiento de los cianobiontes. De hecho, los nucleótidos GTP γ (s) exógenos potencian la contracción del músculo liso, por un aumento de la fosforilación de la cadena ligera en la serina 19, mediante la actuación de la enzima quinasa correspondiente (Kubota *et al.*, 1992). Esta fosforilación, podría ser la respuesta a la inhibición de la proteína fosfatasa, pudiendo estar ambos acontecimientos sujetos a procesos de regulación combinados (Tang *et al.*, 1993). Ensayos de polimerización de filamentos de actina *in vitro* han demostrado que la polimerización mediante GTP γ (s) era ineficaz, sin embargo, la presencia de GTPasas como Cdc42 junto al nucleótido homólogo a GTP inducía la polimerización de la actina lo que sugiere que la respuesta esta mediada por el intercambio de nucleótidos de guanina (Zigmond *et al.*, 1997).

La presencia de GDP β (s) junto con faloidina y blebistatina, provocó una reversión de la inhibición comparando los resultados obtenidos con el número de células tratadas únicamente con los inhibidores del movimiento. La bebistatina provoca la liberación de las GEFs para Rac/Cdc42, lo que estimula el intercambio de GDP por GTP para generar la formas activadas de las GTPasas (Smith *et al.*, 2002). Sin embargo el GDP β (s), un desactivador de las GTPasas (Peterson *et al.*, 1999), generará complejos inactivos incapaces de activar la inhibición de la fosforilación y por lo tanto el movimiento mediado por el citoesqueleto no se vería afectado. El resumen de la ruta de señalización propuesta aparece expuesto en la figura 88.

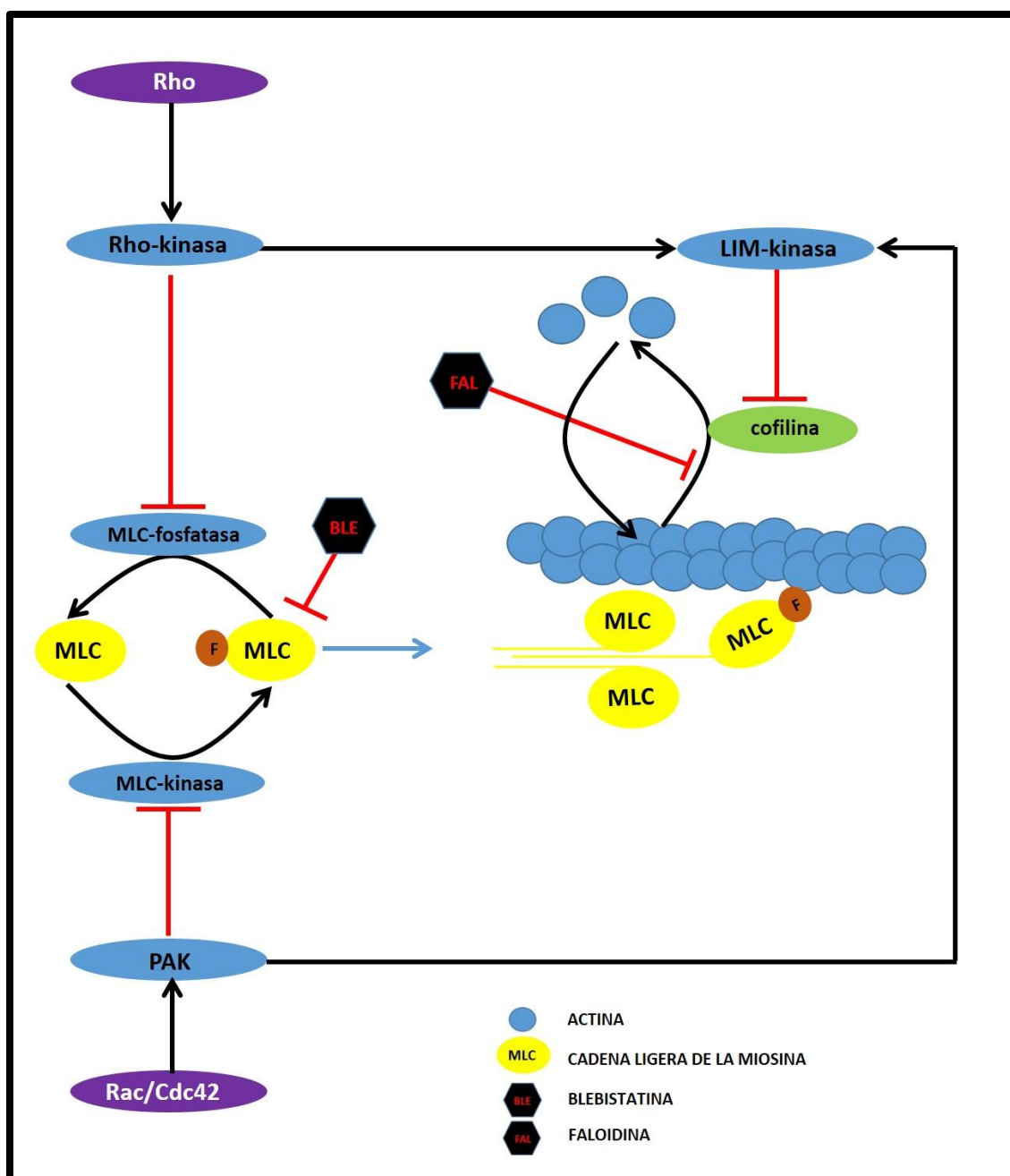


Figura 88. Esquema teórico de la regulación del desplazamiento producido por el citoesqueleto en los cianobiontes de *P. canina*.

En cualquier caso, a la vista de los datos obtenidos se puede inferir que las proteínas G participan en la activación y modulación del citoesqueleto de los cianobiontes de *P. canina*. La detección de la lectina por parte de un receptor de pared celular, desencadena en el fotobionte un proceso de transducción de esa señal mediado por GTPsas produciendo una serie de etapas secuenciales que permiten regular la distribución del citoesqueleto celular con el fin de producir el desplazamiento de las cianobacterias hacia las cercanías del micelio del micobionte (Figura 89).

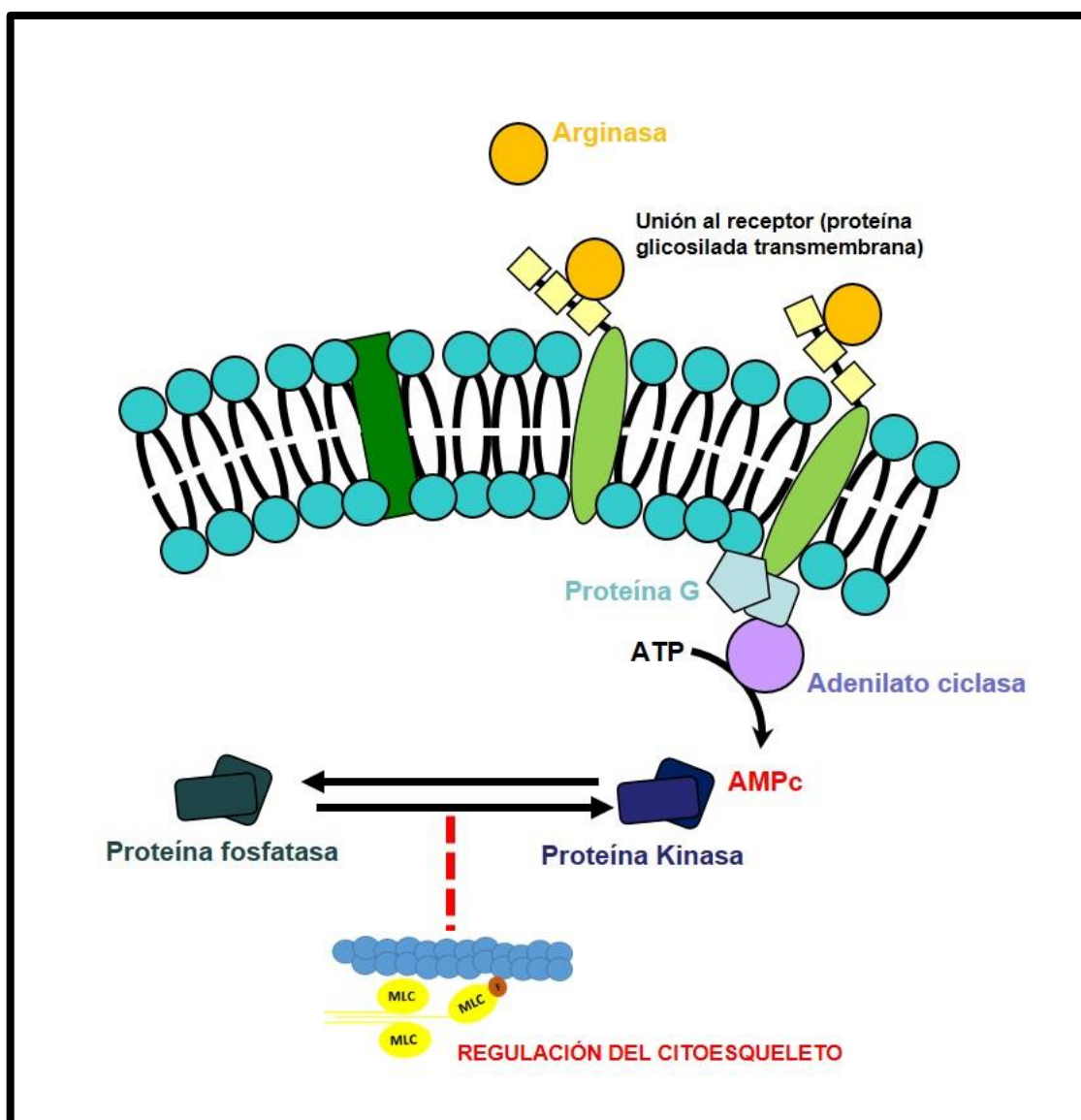


Figura 89. Esquema integrativo de la interacción lectina-ligando y el mecanismo de transducción de señal que produce la reorganización de citoesqueleto necesario para el desplazamiento y mantenimiento de la forma en los cianobiontes de *P. canina*.

Es necesario sin duda, un mayor conocimiento de las interacciones proteína-proteína y de su control por los sistemas de señalización celular mediante técnicas moleculares de inmunodetección o amplificación y/o supresión génica. Entender mejor cómo se genera la especificidad en las distintas cascadas de transducción de señal, comprender cómo el fotobionte integra las distintas señales que recibe en el tiempo, los patrones de localización subcelular de los mensajes generados o las fluctuaciones espacio-temporales de la señal (Downward, 2000), servirá de referencia para el planteamiento de próximos experimentos sobre la quimiotaxis en cianobacterias.

CONCLUSIONES

1. *Peltigera canina* produce proteínas con actividad arginasa que actúan como lectinas fúngicas. Son segregadas en presencia de arginina y se unen a un receptor de pared con actividad ureasa presente en las paredes de los fotobiontes. Del mismo modo que la unión de la lectina fúngica a su ligando en algas implica la inhibición reversible de ambas actividades hidrolíticas en clorolíquenes, la arginasa de *P. canina* es capaz de unirse a ureasas de pared de forma temporal y perder su función enzimática.
2. La reacción de reconocimiento implica la existencia de un dominio en la mitad peptídica de las lectinas capaz de establecer enlaces de afinidad con dos azúcares distintos en la mitad polisacáridica del receptor, donde uno liga α -D-galactosa y un segundo dominio interacciona con α -D-manosa. Se puede porponer, por tanto, la existencia de dos posibles ligandos para la arginasa fúngica siendo ambos receptores localizados en la pared celular de *Nostoc*. La ureasa debe existir glicosilada conteniendo un α -1,4-D-galactósido unido a la cadena polipeptídica mientras que un segundo receptor de pared contiene manosa.
3. La lectina producida por *P. canina* es capaz de unirse tanto a su fotobionte homólogo (aislado de la misma especie) como a clorobiontes procedentes de *E. prunastri*. Este reconocimiento cruzado puede darse en condiciones experimentales donde la lectina homóloga desplaza eficazmente a la lectina heteróloga previamente unida al receptor de pared del fotobionte.
4. Los monómeros de arginasa de *Peltigera* tienen una masa molecular de 37 kDa mientras que *Evernia* tienen una masa molecular mayor (42 kDa), diferencias que podrían traducirse en discrepancias funcionales. Hecho que justificaría la capacidad de reconocer un único receptor poligalactosilado por parte de la lectina de *Evernia* mientras que la de *Peltigera* podría reconocer receptores semejantes así como otros que contengan manosa.
5. El aumento de los niveles de putrescina captada por las células desde el medio externo induce cambios fisiológicos en los cianobiontes, destabilizando las membranas y minimizando la efectividad fotosintética. Contrariamente al modelo de incompatibilidad en clorobiontes, la activación de las glucanasas en las células *Nostoc* no aumenta con valores crecientes de la diamina.

6. Las lectinas de *P. canina* no solo producen reconocimiento mediante la unión a su receptor sino que actúan como señal quimiotáctica.
7. La formación de hormogonios es esencial para el movimiento en medio líquido de las células de *Nostoc* hacia el efector quimiotáctico, mediado por el complejo acto-miosina del citoesqueleto. La inhibición del movimiento de los cianobiontes mediante la utilización de inhibidores del citoesqueleto y la utilización de anticuerpos específicos para actina y miosina, ponen de manifiesto la participación de ambas proteínas o proteínas homólogas durante el desplazamiento celular.
8. La detección de la lectina fúngica por parte de un receptor de pared de las células *Nostoc* desencadena en el fotobionte un proceso de transducción de señal para la quimiotaxis mediado por proteínas G activadoras de adenilato ciclasa lo permite regular la distribución del citoesqueleto celular con el fin de producir el desplazamiento de las cianobacterias hacia las mediaciones de las hifas liquenizadas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Ab-El-Basset, E.M.; Fedoroff, S.** (1994). Contractile units in stress fibers of fetal human astroglia in tissue culture. *J Chem Neuroanat*, 7: 113–122.
- Ackland, J.; C.; West, J.A.; Pickett-Heaps, J.** (2007). Actin and myosin regulate pseudopodia of *Porphyra pulchella* (Rhodophyta) archeospores. *J Phycol*, 43: 129-38.
- Adams, D. G.** (2000). Symbiotic interactions. En: Whitton, B.; Potts, M. (Ed.). *Ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. (pp. 523-561). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Adams, D.G.; Ashworth, D.; Nelmes B.** (1999). Fibrillar Array in the Cell Wall of a Gliding Filamentous Cyanobacterium. *J Bacteriol*, 181 (3): 884-892.
- Adams, D.G.; Bergman, B.; Nierzwicki-Bauer, S.A.; Rai, A.N.; Schubler A.** (2006). Cyanobacterial-plant symbioses. En: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E. (Ed). *The Prokaryotes, Vol 1*. (pp. 331–363). Springer, New York.
- Adams, D.G.; Duggan, P.S.** (2008). Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *J Exp Bot*, 59 (5): 1047-1058.
- Agarwal, S.; Hunnicutt, D.W.; McBride, M.J.** (1997). Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* (Cytophaga johnsonae) gliding motility gene, *gldA*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 12139-12144.
- Ahmadjian, V.; Russell, L.A.; Hildreth, K.C.** (1980). Artificial reestablishment of lichens. I. Morphological interactions between the phycobionts of different lichens and the mycobionts *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia*, 72: 73–89.
- Ahmadjian, V.** (1993). Coevolution in lichens. *Am New York Acad Sci*, 503: 307-315.
- Ahmadjian, V.** (1993). *The Lichen Symbiosis*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ahmadjian V.; Jacobs, J.B.** (1981). Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature*, 289: 169–172.
- Ahmadjian V.; Jacobs J.B.; Russell, L.A.** (1978). Scanning electron microscope study of early lichen synthesis. *Science*, 200: 1062-1064.
- Aisaka, K.; Uwajima, T.; Terada, O.** (1984). Kinetic properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*. *Agric Biol Chem*, 48: 1425-1431.
- Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K., Walter, P.** (2006). El citoesqueleto. En: *Introducción a la Biología Celular*. (pp. 573-610). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 2ª Ed.
- Allen, P. G.; Janmey, P. A.** (1994). Gelsolin displaces phalloidin from actin filaments. *J Biol Chem*, 269: 32916-32923.

- Allingham, J.S.; Zampella, A.; D'Auria, M.V.; Rayment, I.** (2005). Estructures of microfilament destabilizing toxins bound to actin provide insight into toxin desing and activity. *Proc Natl Acad Sci*, 102: 14527-14532.
- Ambrosi, M.; Cameron, N.R.; Davis, B.G.** (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Orga Biomol Chem*, 3: 1593-1608.
- Aprile G. G.; Catalano I.; Migliozi A.; Mingo A.** (2011). Monitoring Epiphytic Lichen Biodiversity to Detect Environmental Quality and Air Pollution: the Case Study of Roccamonfina Park (Campania Region-Italy). En: Moldoveanu, A. M. (Ed.). *Air Pollution - New Developments*. (pp. 227-244). Rijeka, Croatia: Intech.
- Arimura, S.; Tsutsumi, N.** (2002). A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *PNAS*, 99 (8): 5727–5731.
- Arthur, W. T.; Petch, L. A.; Burridge, K.** (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10, 719–722.
- Bačkor, M.; Kováčik, J.; Dzubaj, A.; Bačkorová, M.** (2009). Physiological comparison of copper toxicity in the lichens *Peltigera rufescens* (Weis) Humb. and *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss. *Plant Growth Regulation*, 58 (3): 279-286.
- Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P.** (2011). Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro*, 25 (1): 37–44.
- Bačkorováa, M.; Jendželovskýa, R.; Kelloa, M.; Bačkorb, M.; Mikeša, J.; Fedoročkoa, P.** (2012). Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26 (3): 462–468.
- Bais, H.; G. Ravishankar.** (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss and Org Cult*, 69: 1-34.
- Barden, J. A.; Miki, M.; Hambly, B. D.; dos Remedios, C. G.** (1987). Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur J Biochem*, 162: 583-588.
- Bardy, S.L.; Ng, S.Y.; Jarrell, K.F.** (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149: 295–304.
- Barrero, E.; Ortega, S.** (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. Serie naturaleza, Cuadernos de medio ambiente, 5 (pp. 522). Oviedo, Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias y KRK Ediciones.
- Bayer, E.A.; Skutelsky, E.; Wynne, D.; Wilchek, M.** (1976). Preparation of ferritin-avidin conjugates by reductive alkylolation for use in electron microscopic cytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 24 (8): 933-939.
- Bean G.J.; Flickinger ST.; Westler, W.M.; McCully, M.E.; Sept, D.; Weibel, D.B.; Amann, K.J.** (2009). A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by

- directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry*, 9: 48(22):4852-7.
- Bellé, N.A.; Dalmolin, G.D.; Fonini, G.; Rubin, M.A.; Rocha, J.B.** (2004). Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res*, 1008 (2): 245-51.
- Belnap, J.** (2002). Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *BioFertil Soils*, 35: 128-135.
- Bemet, W.M.; Moosekkee, M.S.** (1993). Molecular motors. Keeping out the rain. *Nature*, 365: 785-786.
- Bergman, B.; Rai, A.N.; Johansson, C.; Söderbäck, E.** (1993). Cyanobacterial-plant symbioses. *Symbiosis*, 14: 61-81.
- Bermudes, D.; Hinkle, G.; Margulis, L.** (1994). Do prokaryotes contain microtubules? *Microbiol Rev*, 58: 387-400.
- Besford, R.T.; Richardson, C.M.; Campos, J.L.; Tiburcio, A.F.** (1993). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta*, 189: 201-206.
- Bhaya, D.; Bianco, N.R.; Bryant, D.; Grossman, A.** (2000). Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Mol Microbiol*, 37: 941-51.
- Bjökman, O.; Demmig, B.** (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- Bleuler-Martínez, S.; Butschi, A.; Garbani, M.; Wälti, M.A.; Wohlschlager, T.; Potthoff, E.; Sabotić, J.; Pohleven, J.; Lüthy, P.; Hengartner, M.O.; Aebi, M.; Künzler, M.** (2011). A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. *Mol Ecol*, 20 (14): 3056-70.
- Bhaya, D.** (2004). Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria. *Molecular Microbiology*, 53 (3): 745-754.
- Bi, E.; Lutkenhaus, J.** (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354: 161-164.
- Bouchereau, A.; Aziz, A.; Larher, F.; Martin-Tanguy, J.** (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140: 103-125.
- Bork, P.; Sander, C.; Valencia, A.** (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins. *Proc iXatl Acad Sci USA*, 89: 7290-7294.
- Bos, J.L.; Rehmann, H.; Wittinghofer, A.** (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129: 865-877.
- Bradley, D.E.** (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO pili: twitching motility. *Can J Microbiol*, 26 (2): 146-154.

- Brahamsha, B.** (1996). An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the non flagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6504-6509.
- Bubrick, P.** (1998). Effects of symbiosis on the photobiont. En: Galun, M. (Eds.) *Handbook of Lichenology*, vol. 2 (Pp. 133-134). CRC Press, Boca raton, FL.
- Bubrick, P.; Galun, M.** (1980). Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patters and cell wall cytochemistry. *Protoplasma*, 104: 167-173.
- Bubrick, P.; Galun, M.; frensdorf, A.** (1981). Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. *Protoplasma*, 105: 207-211.
- Bubrick, P.; Frensdorff, A.; Galun, M.** (1985). Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Isolation an partial purification of an algal-binding protein. *Symbiosis*, 1: 85-95.
- Büdel, B.** (1992). Taxonomyof lichenized procarytic blue-green algae. En: Reisser, W. (Ed.). *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses. Interactions Explored* (pp. 301-324). Bristol: Biopress Ltd.
- Bugyi, B.; Carlier, M.F.** (2010). Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility. *Annual Review of Biophysics*, 39: 449-470.
- Bulyha, I.; Hot, E.; Huntley, S.; Søgaard-Andersen, L.** (2011). GTPases in bacterial cell polarity and signalling. *Current Opinion in Microbiology*, 14 (6): 726–733.
- Burchard, R.P.** (1981). Gliding motility. *Annu Rev Microbiol*, 35: 497–529.
- Brown, D. H.; Rapsch, S.; Beckett, A.; Ascaso, C.** (1987). The effect of desiccation on cell shape in the lichen *Parmelia sulcata*Taylor. *New Phytol*, 105: 295-299.
- Caffaro, S. V.; Mateos, J. L.; Vicente, C.** (1996). Changes in the activity of an enzymatic marker bound to plasmalemma during the photoperiodic flowering induction of soybean. *Phyton*, (Austria), 36: 9-28.
- Cameron, L.C.; Machado, M.; Meza, G.** (2003). Las miosinas en el movimiento celular I. Estructura y propiedades cinéticas. *Revista de Educación Bioquímica*, 22 (2): 53-59.
- Campbell, E.L.; Meeks, J.C.** (1989) Characteristics of hormogonia formation by symbiotic *Nostoc* spp. In response to the presence of *Anthoceros punctatus* or its extracellular products. *Appl Environ Microbiol*, 55: 125–131.
- Campbell, E.L.; Christman, H.; Meeks, J.C.** (2008). DNA Microarray Comparisons of Plant Factor- and Nitrogen Deprivation-Induced Hormogonia Reveal Decision-Making Transcriptional Regulation Patterns in *Nostoc punctiforme*. *Bacteriol*, 190: 22 7382-7391.

- Capell, T.; Bassie, L.; Christou, P.** (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 9909–9914.
- Capitelli F.; Nosanchuk JD.; Casadevall A.** (2007). Synthetic consolidants attacked by melanin-producing fungi: case study of the biodeterioration of Milan (Italy) Cathedral marble treated with acrylics. *Appl Environ Microbiol*, 73: 271-277.
- Caron, E.** (2003). Rac signalling: a radical view. *Nature Cell Biology* 5, 185-187.
- Casino, P.** (2008). *Estudio de las bases estructurales y enzimáticas del mecanismo de transducción de señal mediado por sistemas de dos componentes*. (Tesis de Doctorado). Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Universidad de Valencia.
- Castenholz, R.W.** (1982). The movements of cyanobacteria. En: Carr, N.G.; Whitton, B.A. (Ed.). *The biology of cyanobacteria*. (pp. 413-439). London: Blackwell.
- Castenholz, R. W.; Waterbury, J. B.** (1989). Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. Preface. En: Staley, J.T.; Bryant, M. P.; Pfennig, N.; Holt, J.G. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (pp. 1710-1727). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Cavalier-Smith, T.** (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 7-76.
- Chaparro de Valencia, M.; Aguirre, J.** (2002). *Hongos liquenizados. Colección Textos*. El Malpensante S.A. Universidad de Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
- Chapman, M.J.; Margulis, L.** (1998). Morphogenesis by symbiogenesis. *Internatl Microbiol*, 1: 319–326.
- Chaponnier, C.; Goethals, M.; Janmey, P.; Gabbiani, F.; Gabbiani, G.; Vandekerckhove, J.** (1995). The specific NH₂-terminal Ac-EEED sequence of alpha smooth actin plays a role in polymerization. *J Cell Biol*, 130:887-895.
- Chastanet, A.; Carballido-Lopez, R.** (2012). The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn. *Frontiers in Bioscience*, 4: 1582-1606.
- Chazotte, B.** (2010). Labeling Cytoskeletal F-Actin with Rhodamine Phalloidin or Fluorescein Phalloidin for Imaging, *Cold Spring Harb Protoc*.
- Chiang, P.; Sampaleanu, L.M.; Ayers, M.; Pahuta, M.; Howell, P.L.; Burrows, L.L.** (2008). Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology*, 154: 114–126.
- Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V.** (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The plant Cell*, 3: 1-9.

- Choi, J.S.; Chung, Y.H.; Moon, Y.J.; Kim, C.; Watanabe, M.; Song, P.S.; Joe, C.O.; Bogorad, L.; Park, Y.M.** (1999). Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol*, 70 (1): 95-102.
- Choudhary, M.I.; Ali, M.; Khan, A.; Rasheed, S.; Lal, S.; Rahman, A.U.** (2011). New antiglycation and enzyme inhibitors from *Parmotrema cooperi*. *Science China Chemistry*, 54 (12): 1926-1931.
- Chung, Y.; Park, Y.M.; Luna, Y.; Lee, E.M.; Choi, J.** (2004). Photokinesis de cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Photoscience*, 11 (3), 89-94.
- Cianciotto, N.P.** (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*, 13: 581–588.
- Cleveland, D. W.** (1982). Treadmilling of tubulin and actin. *Cell*, 28: 689–691.
- Cocchietto, M.; Skert, N.; Nimis, P.L. Sava, G.** (2002). A review of usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89: 137-146.
- Collins, C.R.; Farrar, J.F.** (1978). Structural resistance to mass transfer in the lichen *Xanthoria parietina*. *New Phytol*, 81: 71-83.
- Conway, E. J.** (1952). Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. London: Crosby Loockwood.
- Cooper, J.A.** (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol*, 105 (4): 1473-1478.
- Cooper, J. A.; Schafer, D.A.** (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 97–103.
- Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G.** (2008). Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? En: Siddique, Y.H. (Ed.). *Recent Trends in Toxicology*, vol. 37. (pp. 47-59). Kerala: Transworld Research Network.
- Cowles, K.N.; Gitai, Z.** (2010). Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 76: 1411-26.
- Czeczuga, B.; Krukowska, K.R.** (2001). Effect of habitat conditions on phycobionts and the content of photosynthesising pigments in five lichen species. *J Hattori Bot Lab*, 90: 293– 305.
- Dancker. P.; Löw, I.; Hasselbach, W.; Wieland, T.** (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta* 19, 400 (2):407-14.
- Daniel, R.A.; Errington, J.** (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, 113: 767–776.

- Das, N.; Kayasth, A.M.; Malhotra, O.P.** (1998). Immobilization of urease from pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnol Appl Biochem*, 27 (1): 25-9.
- Dayraud, C.; Alié, A.; Jager, M.; Chang, P.; Le Guyader, H.; Manuel, M.; Quéinnec, E.** (2012). Independent specialisation of myosin II paralogues in muscle vs. non-muscle functions during early animal evolution: a ctenophore perspective. *BMC Evolutionary Biology* 12:107.
- Defeu, H.J.; Graumann, P.L.** (2004). Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Reports*, 5: 789-794.
- Defeu, H.J.; Graumann, P.L.** (2010). *Bacillus subtilis* MreB paralogues have different filament architectures and lead to shape remodelling of a heterologous cell system. *Mol Microbiol*, 78: 1145-58.
- Delley, P.; Hall, M.** (1999). Cell Wall Stress Depolarizes Cell Growth Via Hyperactivation of RHO1. *The Journal of Cell Biology*, 147: 1 163–174.
- Delph, L. F.** (1999). Sexual dimorphism in life history. En: Geber, M. A., Dawson, T. E.; Delph, L. F. (Ed.). *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. (pp. 149-174). Berlin: Springer- Verlag.
- Demetriou, G.; Neonaki, C.; Navakoudis, E.; Kotzabasis, K.** (2007). Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus-The protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 272–280.
- Derman, A.L.; Becker, E.C.; Truong, B.D.; Fujioka, A.; Tucey, T.M.; Erb, M.L.; Patterson, P.C.; Pogliano, J.** (2009). Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: Regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Mol Microbiol*, 73: 534–552.
- Derewenda, Z.; Yariv, J.; Helliwell, J.R.; Kaeb, A.J.; Dodson, E.J.; Papiz, M.Z.** (1989): The structure of the saccharide binding site of Concanavalin A, *EMBO J*, 8: 2189–2193.
- De Hoff, P.; M. Brill, L.M.; Hirsch, A.** (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics*, 282 (1): 1–15.
- De Lozanne, A.; Spudich, J.A.** (1987). Disruption of *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236, 1086–1091.
- DePriest, P.T.** (2004). Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986– 2001. *Annu Rev Microbiol*, 58: 273–301.
- Dias, D.A.; Urban, S.** (2009). Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*. *Nat Prod Commun*, 4: 959–964.
- Diaz, E.M.; Sacristán, M.; Legaz M.E.; Vicente, C.** (2009). Isolation and characterization of a cyanobacterium-binding protein and its cell wall receptor in the lichen *Peltigera canina*. *Plant Signaling & Behavior*, 4:7, 598-603.

- Díaz, E.M.; Vicente-Manzanares, M.; Sacristán, M.; Vicente, C.; Legaz M.E. (2011). Fungal lectin of *Peltigera canina* induces chemotropism of compatible *Nostoc* cells by constriction-relaxation pulses of cyanobiont cytoskeleton. *Plant Signaling & Behavior*, 6:11, 1-12.
- Diehn, B.; Feinleib, M. E.; Haupt, W.; Hildebrand, E.; Lenci, F.; Nultchh, W. (1979). Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. *Photochem Photobiol*, 26: 559–560.
- D'Heygère, F.; Rabhi, M.; Boudvillain, M. (2013). Phyletic distribution and conservation of the bacterial transcription termination factor Rho. *Microbiology*, 159: 1423-36.
- Dittmann, E.; Neilan, B.A.; Borner, T. (2001). Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 467–473.
- Doetsch, R. N.; Hageage, G.J. (1968). Motility in prokaryotic organisms: Problems, points of view and perspectives. *Biol Rev*, 43: 317-362.
- Doi, M.; Wachi, M.; Ishino, F.; Tomioka, S.; Ito, M.; Sakagami, Y.; Suzuki, A.; Matsushashi, M. (1988). Determinations of the DNA sequence of the MreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 170: 4619– 4624.
- Dorr, J.; Hurek, T.; Reinhold-Hurek, B. (1998). Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol Microbiol*, 30: 7–17.
- Downward, J. (2000): The ins and outs of signalling. *Nature*, 411: 759-62.
- Duggan, P.S.; Gottardello, P.; Adams, D.G. (2007). Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. *J Bacteriol*, 189: 4547-4551.
- Dye, N.A.; Pincus, Z.; Theriot, J.A.; Shapiro, L.; Gitai, Z. (2005). Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 18608-18613.
- Eddy, R.J.; Pierini, L.M.; Matsumura, F.; Maxfield, F.R. (2000). Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci*, 113: 1287–1298.
- Elifio, S.L.; da Silva, M.L.C.C.; Iacomini, M.; Gorin, P.A.J. (2000). A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *New Phytologist*, 148: 327–334.
- Elix J. A. (1996). Biochemistry and secondary metabolites. En: NASH T. H. III (Ed.). *Lichen biology*. (pp. 150-180). Cambridge: University Press.
- Elix, J. A.; Stocker- Wörgötter, E. (2008). Biochemistry and secondary metabolites. En: NASH T. H. III (Ed.). *Lichen biology*. (pp. 104-133). Cambridge: University Press.
- El Sayed, K.A.; Youssef, D.T.; Marchetti, D. (2006). Bioactive natural and semisynthetic latrunculins. *J Nat Prod*, 69: 219-223.

- El Shora HM.** (2001). Properties and immobilization of urease from leaves of *Chenopodium album*. *Bot Bull Acad Sin*, 42: 251-8.
- Epstein, L.; Nicholson, R. L.** (1997). Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. En: Carroll, G.; Tudzynski, P. (Ed.). *The Mycota (V Part). A Plant Relationships*. (pp. 11-25) Berlin: Springer-Verlag.
- Erickson, H.P.** (2007). Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays*, 29: 668–677.
- Errington, J.** (2003). Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat Cell Biol*, 5: 175–178.
- Esue, O.; Wirtz, D.; Tseng, Y.** (2006). GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *J Bacteriol*, 188: 968–976.
- Etienne-Manneville, S.; Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629–35.
- Ettema, T.J.G.; Lindås, A.; Bernander, R.** (2011). An actin-based cytoskeleton in archaea. *Molecular Microbiology*, 80 (4): 1052–1061.
- Evans, R.D.; Ehleringer, J.R.** (1993). A break in the nitrogen cycle in arid lands? Evidence from N₁₅ of soils. *Oecologia*, 94: 314-317.
- Even-Ram, S., A.D. Doyle, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, and K.M. Yamada.** (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*, 9: 299–309.
- Fariers, A.; Wuilmart, C.; Sharon, N.; Strosberg, D.** (1977). Extensive sequence homologies among lectin from leguminous plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 75: 980-986.
- Fashelt. D.** (1994). Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis*, 16: 117–165.
- Fath, M. J.; Kolter, R.** (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*, 57: 995-1017.
- Faulstich, H.; Zobeley, S.; Heintz, D.; Drewes, G.** (1993). Probing the phalloidin binding site of actin. *FEBS Letters*, 318: 218-222.
- Feoktistov, A.S.; Kitashov, A.V.; Lobakova, E.S.** (2009). The characterization of lectins from the tripartite lichen *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. *Mosc. Univ Biol Sci Bull*, 64: 23–27.
- Fiechter, E.; Honegger, R.** (1988). Seasonal variations in the fine structure of *Hypogymnia physodes* (lichenized Ascomycetes) and its *Trebouxia* photobionts. *Plant System Evol*, 158: 249–263.
- Fischer, M.; Kaech, S.; Knutti, D.; Mattus, A.** (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20: 847–854.
- Flink, I.; Pettijohn, D.E.** (1975). Polyamines stabilise DNA folds. *Nature*, 253: 62-63.

- Fontaniella, B.; Millanes, A.M.; Vicente, C.; Legaz, M.E.** (2004). Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiol Biochem*, 42 (10): 773-9.
- Forsberg, A.; Guina, T.** (2007). Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*, 1105: 187–201.
- Friedl, T.; Büdel, B.** (1996). Photobionts. En: Nash III, T.H. (Ed.). *Lichen Biology*. (pp: 8-23). Cambridge: University Press, Cambridge.
- Fujisawa, T.; Narikawa, R.; Okamoto, S.; Ehira, S.; Yoshimura, H.; Suzuki, I.; Masuda, T.; Mochimaru, M.; Takaichi, S.; Awai, K.; Sekine, M.; Horikawa, H.; Yashiro, I.; Omata, S.; Takarada, H.; Katano, Y.; Kosugi, H.; Tanikawa, S.; Ohmori, K.; Sato, N.; Ikeuchi, M.; Fujita, N.; Ohmori, M.** (2010). Genomic Structure of an Economically Important Cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res*, 17 (2): 85–103.
- Fulgosi, H.; Gerdes, L.; Westphal, S.; Glockmann, C.; Soll, J.** (2002). Cell and chloroplast division requires ARTEMIS. *PNAS*, 99 (17): 11501–11506.
- Fullner, K.J.; Mekalanos, J.J.** (1999). Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 67: 1393–1404.
- Gaballah, A.; Kloeckner, A.; Otten, C.; Sahl, H.G.; Henrichfreise, B.** (2011). Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PloS one* 6(10):e25129.
- Galston A. W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., and Tiburcio A. F.** (1997). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* 110, 197D207.
- Galun, M.; Ben-Shaul, Y.; Paran, N.** (1971). Fungus-alga association in lichens of the *Teloschistaceae*: an ultrastructural study. *New Phytol*, 70: 837-839.
- Galun, M.; Braun, A.; Frensdorff, A.; Galun, E.** (1976). Hyphal walls of isolated lichen fungi: autoradiographic localization of precursor incorporation and binding of fluorescein conjugated lectins. *Arch Microbiol*, 3 (108-1): 9-16.
- Galun, M.; Bublitz, P.** (1984). Physiological interactions between the partners of lichen symbiosis. En: Encyclopedia of Plant Physiology. Cellular Interactions. Linskens, H.F. and Heslop-Harrison (Ed.). *Microbiol*, 108: 9–16.
- Galun, M.; Garty, J.** (1988). Soredia formation of compatible and incompatible lichen symbionts. En: Cannerini, S.S.; Bonfante-Fasolo, P.; and Gianinazzi-Pearson, V. (Ed.). *Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis*, Vol. H17. (pp. 207-217). Berlin: Springer-Verlag.
- Galun, M.; Kardish, N.** (1995). Lectins as a determinants of symbiotic specificity in lichens. *Cryptog Bot*, 5: 144-148.

- Gantt, E. (1994).** Supramolecular membrane organization. En: Bryant, D.A. (Ed.). *Advances in Photosynthesis. The molecular biology of cyanobacteria*. (pp. 409-435). Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.
- Geisler, M.; Jakobs, B.; Richter, J.; Schumann, J. (1996).** Cotranscription of a GTPase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 and a P-type Ca^{2+} -ATPase gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1309 (3): 189–193.
- Gitai, Z.; Dye, N.; Shapiro, L. (2004).** An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 8643–8648.
- Gitai, Z.; Dye, N.A.; Reisenauer, A.; Wachi, M.; Shapiro, L. (2005).** MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*, 120: 329–341.
- Gomori, G. (1952).** *Microscopic Histochemistry*. Chicago: University Press. Pp. 243.
- González, Moreno, S.; Perales Vela, H.; Salcedo Sanchez, M. (2008).** La fluorescencia de las clorofilas como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *REB*, 27(4): 119-129.
- Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J. (2004).** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4 (12): 3665-3685.
- Gottlieb, M.; Chavko, M. (1987).** Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gels. *Anal Biochem*, 165: 33-37.
- Guerrero-Barrera, A.L.; García-Cuéllar, C.M.; Villalba, J.D.; Segura-Nieto, M.; Gómez-Lojero, C.; Reyes, M.E.; Hernández, J.M.; García, R.M.; de la Garza, M. (1996).** Actin-related proteins in *Anabaena* spp. and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 142 (5): 1133-40.
- Guljamow, A.; Delissen, F.; Baumann, O.; Thünemann, A.F.; Dittmann, E. (2012).** Unique Properties of Eukaryote-Type Actin and Profilin Horizontally Transferred to Cyanobacteria. *PLoS ONE* 7 (1): e29926.
- Guven, B.; Howard, H. (2006).** Modelling the growth and movement of cyanobacteria in river Systems. *Science of the Total Environment*, 368: 898–908.
- Häder, D.P. (1987).** Photosensory behavior in procaryotes. *Microbiol Rev*, 51: 1–21.
- Häder, D.P. (1987)** Photomovement. En: Fay, P.; van Baalen, C. (Ed.). *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam.
- Häder D, Burkart U. (1982)** Enhanced Model for Photophobic Responses of the Blue-Green Alga, *Phormidium uncinatum*. *Plant and Cell Physiology* 23: 1391–1400.
- Hager, A. J.; Bolton, D. L.; Pelletier, M. R.; Brittnacher, M. J.; Gallagher, L. A.; Kaul, R.; Skerrett, S. J.; Miller, S. I.; Guina, T. (2006).** Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol*, 62: 227–237.

- Halfen, L.N.; Castenholz, R.W.** (1971). Gliding motility in the blue-green alga *Oscillatoria princeps*. *Journal of Phycology*, 7: 133–145.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 23 (279): 509-514.
- Han, X.; Kennan, R. M.; Parker, D.; Davies, J. K.; Rood, J. I.** (2007). Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. *J Bacteriol*, 189: 5022–5033.
- Haraldsdóttir, S.; Gudlaugsdóttir, E.; Ingolfssdóttir, K.; Ogmundsdóttir, H.M.** (2004). Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Med*, 70: 1098–1100.
- Harshey, R. M.** (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol*, 57: 249–273.
- Hauck, M.; Huneck, S.** (2007). Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. *J Chem Ecol*, 33: 219–223.
- Hawksworth, D.L.** (1988). The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96: 3-20.
- Hawksworth, D.L.; Iturriaga, T.; Crespo, A.** (2005). Líquenes como bioindicadores de contaminación y cambios medio-ambientales en los tópicos. *Ver Iberoam Micol*, 22: 71-82.
- Heath, I.B.** (1987). Preservation of labile cortical array of actin filaments in growing hyphal tips of the fungus *Saprolegnia ferax*. *European Journal of Cell Biology*, 44: 10-16.
- Healt, I.B.** (1994). The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements and mitosis. En: Wessels, J.G.H, Meinhardt, F. (Ed). *The Mycota*. (pp. 43-65). Berlín: Springer-Verlag.
- Henrichsen, J.** (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev*, 36: 478-503.
- Henrichsen, J.** (1975). The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 83: 171–78.
- Henrichsen, J.** (1983). Twitching motility. *Annu Rev Microbiol*. 37: 81–93.
- Higaki, T.; Sano, T.; Hasezawa, S.** (2007). Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Cur Opinion Plant Biol*, 10: 549-56.
- Hill, D.J. (1980).** The physiology of lichens. En: Brown, D.H.; Hawksworth, D.L.; Bailey, R.H. (Ed.), *Lichenology: Progress and Problems*. (pp. 457-473). Academic Press, New York.
- Hill, D.J. (1989).** The Control of Cell Cycle in Microbial Symbionts. *New Phytol*, 112: 175–184.
- Hill, D.J.** (2001). Lichens and Co-Ordination of the Symbionts. *Microbiol Today*, 28: 124–127.

- Hillberga, L.; Rathjea, L.Z.; Nyåkern-Meazzaa, M.; Helfandb, B.; Goldmanb, R.D.; Schuttc, C.E.; Lindberga, U. (2006). Tropomyosins are present in lamellipodia of motile cells. *European Journal of Cell Biology*, 85 (5): 399–409.
- Hill, S.J.; Baker, J.G.; Rees, S. (2001). Reporter gene systems for the study of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 1: 526-532.
- Hirao, T.; Sato, M.; Shirahata, A.; Kamio, Y. (2000). Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 182: 1154-1157.
- Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. (2008). Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *J Cell Sci*, 121: 2795-804.
- Hodges, J.L.; Newell-Litwa, K.; Asmussen, H.; Vicente-Manzanares, M.; Rick Horwitz, A. (2011). Myosin IIB Activity and Phosphorylation Status Determines Dendritic Spine and Post-Synaptic Density Morphology. *PLOS One*, 6:8. e24149.
- Hoedemaeker, F.J.; van Eijsden, R.R.; Díaz, C-L., de Parrker, B.S. ; Kijne, J.W. (1993). Desestabilization of pea lectin by substitution of a single amino acid in a surface loop. *Plant Mol Biol*, 22: 1039-1046.
- Hoiczyk, E. (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch Microbiol*, 174: 11–17.
- Hoiczyk, E.; Baumeister, W. (1995). Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, 177: 2387–2395.
- Hoiczyk, E.; Baumeister, W. (1997). Oscillin, an extracellular, Ca²⁺-binding glycoprotein essential for the gliding motility of cyanobacteria. *Mol Microbiol*, 26 (4):699-708.
- Hoiczyk, E.; Baumeister, W. (1998). The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Current Biology*, 8 (21): 1161-1168.
- Holland, I. B.; Blight, M.A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*, 293: 381-399.
- Holmes, K.C.M.; Popp, D.; Gebhard, W.; Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347: 44–49.
- Honneger, R. (1984). Cytological aspects of the mycobiont-phytobiont relationships in lichens. Haustorial types, phycobiont cell wall types, and the ultrastructure of the cell wall surface layers in some cultured and symbiotic myco- and phycobionts. *Lichenologist*, 16: 11-127.
- Honneger, R. (1987). Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromerous) thalli. *Bibl Lichenol*, 25: 59-71.

- Honegger R.** (2001). The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. En: Hock B. (Ed.). *The mycota. Fungal associations*. (pp. 165–188). Berlin: Springer-Verlag.
- Hosoi, A.** (1951) Secretion of the slime substance in *Oscillatoria* in relation to its movement. *Bot Mag*, 64: 14–16.
- Howe, M.L.; Barrett, J.T.** (1970). Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. *Biochim. Biophys Acta*, 215: 97–104.
- Hu, B.; Yang, G.; Zhao, W.; Zhang, Y.; Zhao, J.** (2007). MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol*, 63: 1640-1652.
- Hunnicut, D. W.; McBride, M.J.** (2000). Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes, *gldB* and *gldC*. *J Bacteriol*, 182: 911-918.
- Hunnicut, D. W.; McBride, M.J.** (2001). Cloning and characterization of the *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes *gldD* and *gldE*. *J Bacteriol*, 183: 4167-4175.
- Hunnicut, D. W.; Kempf, M. J.; McBride, M. J.** (2002). Mutations in *Flavobacterium johnsoniae* *gldF* and *gldG* disrupt gliding motility and interfere with membrane localization of GldA. *J Bacteriol*, 184: 2370–2378.
- Huxley, H.E.** (1973). Muscular contraction and cell motility. *Nature*, 243: 445–449.
- Ikebe M.; Hartshorne, D.J.** (1985). Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, 260: 10027–10031.
- Imberty A.; Casset F.; Gegg, C.V.; Etzler, M.E.; Pérez, S.** (1994). Molecular modeling of the *Dolichos biflorus* seed lectin and its specific interactions with carbohydrates: α -D-N-acetyl-galactosamine, Forssman disaccharide and blood group A trisaccharide. *Glycoconjugate J*, 11: 400-413.
- Incharoensakdi, A.; Jantaro, S.; Raksajit, W.; Mäenpää, P.** (2010). Polyamines in cyanobacteria: biosynthesis, transport and abiotic stress response. En: Méndez-Vilas, A. (Ed.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Sain: Formatex.
- Jaffe, A.B.; Hall, A.** (2002). Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*, 84: 57–80.
- Jaffe, A.B.; Hall, A.** (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 247-269.
- Janetopoulos, C.; Ma, L.; Devreotes, P. N.; Iglesias, P. A.** (2004). Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 101: 8951–8956.
- Janson, S.; Rai, A.N.; Bergman, B.** (1993). The Marine Lichen *Lichina conaenis* (O.F. Mull.) C. Ag.: Ultrastructure and Localization of Nitrogenase, Glutamine

- Synthetase, Phycoerythrin, and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the cyanobiont. *New Phytol*, 124: 149–160.
- Jarrell, K. F.; McBride, M. J.** (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol*, 6: 466–476.
- Jones, L.J.F.; Carballido-López, R.; Errington, J.** (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104: 913–922.
- Joneson, S.; Armaleo, D.; Lutzoni, F.** (2011). Fungal and algal gene expression in early developmental stages of lichen-symbiosis. *Mycologia*, 103 (2): 291–306.
- Joneson, S.; Lutzoni, F.** (2009). Compatibility and thigmotropism in the lichen symbiosis: A reappraisal. *Symbiosis*, 47: 109–115.
- Kaeriyama, M.; Machida, K.; Kitakaze, A.; H. Wang, H.; Lao, Q.; Fukamachi, T.; Saito, H.; Kobayashi, H.** (2006). OmpC and OmpF are required for growth under hyperosmotic stress above pH 8 in *Escherichia coli*. *Lett Appl Micro*, 42: 195–201.
- Kaiser D.** (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5952–56.
- Kamei, A.; Yuasa, T.; Orikawa, K.; Geng, X.; Ikeuchi, M.** (2001). A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 183 (5):1505-10.
- Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirose, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M.; Tabata, S.** (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, 3: 109–136.
- Kardish, N.; Silberstein, L.; Fleminger, G.; Galun, M.** (1991). Lectins from the Lichen *Nephroma laevigatum* Ach. : Localization and Function. *Symbiosis*, 11: 47–61.
- Katayama, M.; Ohmori, M.** (1997). Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol*, 179: 3588–3593.
- Katayama, M.; Wada, Y.; Ohmori, M.** (1995). Molecular cloning of the cyanobacterial adenylate cyclase gene from the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol*, 177: 3873–3878.
- Katsumi, A.; Milanini, J.; Kiosses, W.B.; del Pozo, M.A.; Kaunas, R.; Chien, S.; Hahn, K.M.; Schwartz, M.A.** (2002). Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol*, 158:153–164.

- Kempf, M. J.; McBride, M.J.** 2000. Transposon insertions in the *Flavobacterium johnsoniae* *ftsX* gene disrupt gliding motility and cell division. *J Bacteriol*, 182: 1671-1679.
- Kennan, R. M.; Dhungyel, O. P.; Whittington, R. J.; Egerton, J. R.; Rood, J. I.** (2001). The type IV fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *J Bacteriol*, 183: 4451–4458.
- Kennedy, J.F.; Paiva, P.M.G.; Correia, M.T.S.; Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B.** (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26: 219–230.
- Keren, K.; Yam, P.T.; Kinkhabwala, A.; Mogilner, A.; Theriot, J.A.** (2009). Intracellular fluid flow in rapidly moving cells. *Nat Cell Biol*, 11: 1219–1224.
- Kika, N.** (2006). A Natureza das Substâncias Produzidas por Líquenes. En: *Biologia de Líquens*. Xavier Filho, L.; Legaz, M.E.; Vicente Córdoba, C.; Cristina Pereira, E (Ed.). Pp. 624. Rio de Janeiro: Ambitó Cultural.
- Kika, N.; Wagner, V.** (1998). A química dos líquenes. *Química Nova*, 21(6): 110-125.
- Kim, M.S.; Lee, K.A.** (2006). Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (3): 342-345.
- Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A.** (2008). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10th edition. Cromwell Press, Trowbridge. Pp. 771.
- Kirn, T. J.; Bose, N.; Taylor, R. K.** (2003). Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 49: 81–92.
- Kirn, T. J.; Taylor, R. K.** (2005). TcpF is a soluble colonization factor and protective antigen secreted by El Tor and classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* serogroups. *Infect Immun*, 73: 4461–4470.
- Kitada, M.; Igarashi, K.; Hirose, S.; Kitagawa, H.** (1979). Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 87 (2):388-94.
- Knight, C.D.; Adams, D.G.** (1996). A method for studying chemotaxis in nitrogen fixing cyanobacterium-plant symbioses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 73-77.
- Kolega, J.** (1998). Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci*, 111: 2085–2095.
- Kon, Y.; Kashiwadani, H.; Masada, M.; Tamura, G.** (1993). Artificial syntheses of mycobionts of *Usnea confusa* ssp. *kitamiensis* and *Usnea orientalis* with their natural and non-natural phycobiont. *Journal of Japanese Botany*, 68: 129–137.
- Koonin, E.V.** (1993). A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol*, 229: 1165–1174.

- Korn, E. D., M. F. Carlier, and D. Pantaloni. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, 238: 638–644.
- Krause GH, Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42: 313-349.
- Krieg, N. R. (1976). Biology of chemoheterotrophic *Spirilla*. *Bacteriol Rev*, 40: 55-115.
- Kruse, T.; Blagoev, B.; Lobner-Olesen, A.; Wachi, M.; Sasaki, K.; Iwai, N. (2006). Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 20: 113–124.
- Kruse, T.; Gerdes, K. (2005). Bacterial DNA segregation by the actin-like MreB protein. *Trends in Cell Biology*, 15 (7): 343-345.
- Kruse, T.; Moller-Jensen, J.; Lobner-Olesen, A.; Gerdes, K. (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 22: 5283–5292.
- Kubota, Y.; Nomura, M.; Kamm, K.E.; Mumby, M.C.; Stull, J.T. (1992). GTP gamma S-dependent regulation of smooth muscle contractile elements. *Am J Physiol*, 262: 405-410.
- Kuczmarski, E.R.; Rosembaum, J.L. (1979). Studies on the organization and localization of actin and myosin in neurons. *J Cell Biol*, 80: 356–371.
- Kull, F.J.; Vale, R.D.; Fletterick, R.J. The case for a common ancestor: Kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J Musc Res Cell Motil*, 19:877–886.
- Kumar, A.; Crawford, K.; Close, L.; Madison, M.; Lorenz, J.; Doetschman, T.; Pawlowski, S.; Duffy, J.; Neumann, J.; Robbins, J.; Boivin, G.P.; OToole, B.A.; Lessard, J.L. (1997). Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:4406-4411.
- Kusano, T.; Berberich, T.; Tateda, C.; Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367–381.
- Labbe, J.P.; Harricane, M.C.; Boyer, M.; Derancourt, J.; Roustan, C.; Benyamin, Y. (1996). Biochemical evidence for the presence of an unconventional actin protein in a prokaryotic organism. *Comp Biochem Physiol*; B114:287–93.
- Labbe, J.P.; Harricane, M.C.; Derancourt, J.; Roustan, C.; Benyamin, Y. (1992). Biochemical evidence for the presence of an actin like protein in prokaryotic cyanobacteria group. *J Muscle Res Cell Motil*; 13:241–2.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laine, R.O.; Phaneuf, K.L.; Cunningham, C.; Kwiatkowski, D.; Azuma, T.; Southwick, F.S. (1998). Gelsolin, a Protein That Caps the Barbed Ends and Severs Actin Filaments, Enhances the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes* in Host Cells. *Infect Immun*, 66(8): 3775–3782.

- Lambrechts, A.; Van Troys, M.; Ampe, C.** (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (10):1890-909.
- Landis, D.M.D.; Reese, T.S.** (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J Cell Biol*, 97: 1169–1178.
- Lawrey, J. D.** (1984). *Biology of Lichenized Fungi*. New York: Praeger Publ., N.Y. Pp 407.
- Lawrey, J.D.** (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89: 111–122.
- Lee, C.S.; Choi, C.K.; Shin, E.Y; Schwartz, M.A.; Kim, E.G.** (2010). Myosin II directly binds and inhibits Dbl family guanine nucleotide exchange factors: a possible link to Rho family GTPases. *Journal of Cell Biology* **190**, 663-674
- Lee, C.W.; Vitriol, E.A.; Shim, S.; Wise, A.L.; Velayutham, R.P.; Zheng, J.Q.** (2013). Dynamic localization of G-actin during membrane protrusion in neuronal motility. *Curr Biol*, 23 (12):1046-56.
- Lee, K.A.; Kim, M.S.** (2000). Glucosidase inhibitor from *Umbilicaria esculenta*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 1077–1081.
- Legaz, M.E. (1985).** The regulation of urea biosynthesis. En: Vicente, C.; Brown, D.H.; Legaz, M.E. (Ed). *Surface Physiology of Lichens*. (pp. 57-72). Madrid: Universidad Complutense.
- Legaz, M.E.; Avalos, A.; deTorres, M.; Escribano, M.I.; González, A.; Martín-Falquina, A.; Pérez-Urria, E.; Vicente, C.** (1896). Annual variations in arginine metabolism and phenolics content of *Evernia prunastri*. *Environ Exp Bot*, 26: 385–396.
- Legaz, M. E.; Fontaniella, B.; Millanes, A. M.; Vicente, C.** (2004). Secreted arginases from phylogenetically farrellated lichen act as cross recognition factor for two different algal cells. *Eur J Cell Biol*, 83: 1-12.
- Legaz, M.E.; Millanes, A.M.; Vicente, C. (2006).** Fisiologia dos Lichens. En: Xavier Filho, L.; Legaz, M.E.; Vicente Córdoba, C.; Cristina Pereira, E. (Ed.). *Biologia de Liqueus*. (pp. 343-388). Rio de Janeiro: Ambitó Cultural.
- Legaz, M.E.; Molina, M.C.; Vicente, C.** (2003). Lichen lectins: Glycoproteins for cell recognition. *Current Topics Plant Biol*, 3: 63–78.
- Legaz, M. E.; Vicente, C.** (1982). Two forms of arginase in *Evernia Prunastri*. *Biochem Biophys Res Commun*, 104: 1441-1446.
- Legaz, M. E.; Vicente, C.** (1989). Regulation of urease activity of *Cladonia dendroides* and its photobiont by lichen phenols. *Plant Sci*, 63: 15-24.
- Legaz, M.E.; Vicente, C; Pedrosa, M.** (2001). Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from *Evernia prunastri*. *J Biochem Mol Biol*, 34: 194-200.

- Lehr, H.; Flemiinger, G.; Galun, M.** (1995). Lectin from the lichen *Peltigera membranacea* (Ach.) Nyl.: characterization and function. *Symbiosis*, 18: 1–13.
- Lehr, H., Galun, M.; Ott, S., Jahns, H.M.; Fleminger, G. (2000).** Cephalodia of the lichen *Peltigera aphthosa*. Specific recognition on the compatible photobiont. *Symbiosis*, 29: 357-365.
- Leipe, D.D.; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V.; Aravind, L.** (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, 317:41–72.
- Lenartowska M, Michalska A.** (2008). Actin filament organization and polarity of pollen tubes revealed by myosin II subfragment 1 decoration. *Planta*, 228: 891-6.
- Levine, H.; Kessler, D. A.; Rappel, W-J.** (2006). Directional sensing in eukaryotic chemotaxis: A balanced inactivation model. *PNAS*, 26 (103): 9761–9766.
- Lewis, P.J.** (2004). Bacterial subcellular architecture: recent advances and future prospects. *Mol. Microbiol.*, 54: 1135–1150.
- Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J.** (1989). The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Academic Press.
- Liles, M.R.; Viswanathan, V.K.; Cianciotto, N.P.** (1998). Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun*, 66: 1776–82.
- Limouze, J.; Straight, A. F.; Mitchison, T. J.; Sellers, J. R.** (2004). Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 25: 337–341.
- Lis, H.; Sharon, N.** (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev*, 98 (2): 637-674.
- Lockhart, C.M.; Rowell, P.; Stewart, W.D.P.** (1978). Phytohaemagglutinin from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiol*, 3: 127-130.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaria, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J.** (2005). Biomembranas y arquitectura celular. En: Karp, G. *Biología celular y molecular*. 5ª Ed. (pp. 147-196). Argentina: Médica Panamerica.
- Loudon, R.P., L.D. Silver, H.F. Yee Jr., and G. Gallo.** (2006). RhoA-kinase and myosin II are required for the maintenance of growth cone polarity and guidance by nerve growth factor. *J Neurobiol*, 66:847–867.
- Löwe, J.; van den Ent, F.; Linda, A.; Amos, J. A.** (2004). Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33: 177-198.
- Löwe J.; Amos, L.A.** (1998). Crystal structure of the bacterial cell division protein FtsZ. *Nature*, 391: 203–206.

- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L.; Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Lücking, R.; Lawrey, J.D.; Sikaroodi, M.** (2009) Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *American Journal of Botany*, 96: 1409–1418.
- Lutzoni, F.; Pagel, M.; Reeb, V.** (2001). Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature*, 411 (6840): 937-940.
- Maciver, S. K.; Zot, H.G.; Pollard, T.D.** (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol*, 115: 1611–1620.
- Macnab, R. M.** (1978). Bacterial motility and chemotaxis: The molecular biology of a behavioral system. *CRC Crit Rev Biochem*, 3: 291-341.
- Macnab R.M.** (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol*, 181: 7149–7153.
- Mahdi, E.; Fariba, K.** (2012). Cancer treatment with using cyanobacteria and suitable drug delivery system. *Annals of Biological Research*, 3 (1): 622-627.
- Marx, M.; Peveling, E.** (1983). Surface receptors in lichen symbionts visualized by fluorescence microscopy after use of lichens. *Protoplasma* 114: 52-61.
- Mascarenhas, J.P.** (1978). Sexual chemotaxis and chemotropism in plants. En: Hazelbauer, G.L. (Ed.) *Taxis and behaviour*. (pp. 169-204). London: Chapman and Hall.
- Mattick, J. S.** (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Micro Biol*, 56: 289–314.
- Mattick, J.S.; Hobbs, M.; Cox, P.T. Dalrymple, BP.** (1993). Molecular biology of the fimbriae of *Dichelobacter* (prev. *Bacteroides*) *nodosus*. En: Sebald, M. (Ed.). *Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria*. (pp. 517-45) New York: Springer.
- Mattick, J.S.** (2002). Type IV pill and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56: 289-314.
- Matus, A.; Ackerman, M.; Pehling, G.; Byers, H.R.; Fujiwara, K.** (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7590–7594.
- Maupin, P.; Phillips, C.L.; Adelstein, R.S.; Pollard, T.D.** (1994). Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci*, 107(11): 3077–3090.
- Mauriello, E.M.; Mouhamar, F.; Nan, B.; Ducret, D.; Dai, D.; Zusman, D.R.; Mignot, T.** (2010). Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue, MglA. *Embo J*, 29: 315-26.

- Mayer, J.A.; Amann, K.J.** (2009). Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66: 109–118.
- McBride.** (2001). Bacterial gliding motility: Multiple Mechanisms for Cell Movement over Surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 55: 49–75.
- McCarren, J.; Brahamsha, B.** (2005). Transposon Mutagenesis in a Marine *Synechococcus* Strain: Isolation of Swimming Motility Mutants. *J Bacteriol*, 187 (13): 4457-4462
- McCarren, J.; Brahamsha, B.** (2007). SwmB: a 1.12 MDa protein that is required for non-flagellar swimming motility in *Synechococcus*. *J Bacteriol* 189:1158-1162.
- McCarren, J.; Brahamsha, B.** (2009). Swimming motility mutants of marine *Synechococcus* affected in production and localization of the S-layer Protein SwmA. *J Bacteriol*, 191:1111-1114.
- Meeßen, J.; Eppenstein, S. Ott, S.** (2013). Recognition mechanisms during the pre-contact state of lichens: II. Influence of algal exudates and ribitol on the response of the mycobiont of *Fulgensia bracteata*. *Symbiosis*, 59 (3): 131-143.
- Meeks, J.C.** (2003). Symbiotic interactions between *Nostoc punctiforme*, a multicellular cyanobacterium, and hornwort *Anthotceros punctatus*. *Symbiosis*, 35: 55-71.
- Meeks, J.C.; Campbell, E.C.; Summers M.C.; Wong, F.C.** (2002). Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of microbiology*, 178: 395-403.
- Meeks, J.C.; Elhai, J.** (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 94-121.
- Mehrotra, R.S.; Aneja, K.R.** (1990). *An introduction to Mycology*. Wiley Eastern Limited, New Delhi. Pp. 706.
- Meili, R.; Alonso-Latorre, B.; del Alamo, J.C.; Firtel, R.A.; Lasheras, J.C.** (2010). Myosin II is essential for the spatiotemporal organization of traction forces during cell motility. *Mol Biol Cell*, 21(3):405–417.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T. B., Ma, H. & Firtel, R. A.** (1999). Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in *Dictyostelium*. *EMBO J*, 18: 2092–2105.
- Merz, A. J.; So, M.; Sheetz, M.P.** (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407: 98–102.
- Miao V.P.W.; Manoharan, S.S.; & Snæbjarnarson, V.; Andrésson, O.S.** (2012). Expression of lec-1, a mycobiont gene encoding a galectin-like protein in the lichen *Peltigera membranacea*. *Symbiosis*, 57 (1): 23-31
- Michie, K.A.; Löwe, J.** (2006). Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Ann Rev Biochem*, 75: 467–492.

- Mignot, T.** (2007). The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci*, 64: 2733–2745.
- Mignot T.; Shaevitz J.W.; Hartzell P.L.; Zusman, D.R.** (2007). Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science*, 315: 853–856.
- Millanes, A. M.; Fontaniella, B.; García, M.L.; Solas, M.T.; Vicente, C.; Legaz, M. E.** (2004). Cytochemical location of urease in the cell wall of two different lichen phycobionts. *Tissue and Cell*, 36: 373–377.
- Millanes, A.M.; Vicente, C.** (2003). Photoprotective strategies in lichens: an experimental approach using *Evernia prunastri*. *J Hattori Bot Lab*, 94: 293–302.
- Milloning, G.** (1961). Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J Appl Physiol*, 32: 1637–1639.
- Min, Y. N.; Tabuchi, A.; Fan, Y.L.; Womble, D.D.; Rownd, R.H.** (1988). Complementation of mutants of the stability locus of IncFII plasmid NR1. Essential functions of the trans-acting stbA and stbB gene products. *J Mol Biol*, 204: 345–356.
- Molina, M.C.; Muñiz, E.; Vicente, C.** (1993). Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. *Plant Physiol Biochem*, 31: 131–142.
- Molina, M.C.; Stocker-Wörgötter, E.; Turk, R.; Bajon, C.; Vicente, C.** (1998). Secreted, glycosylated arginase from *Xanthoria parietina* thallus induces loss of cytoplasmic material from *Xanthoria* photobionts. *Cell Adh Commun*, 6: 481–490.
- Molina, M.C.; Vicente, C.** (1993). Loss of photoergonic conditions of *Xanthoria parietina* photobiont effected by and algal-binding protein isolated from the same lichen species. En: Sato, S.; Ishida, M.; Ishikawa, H. (Ed.). *Endocytobiology V: Endocytobiology and Symbiosis*. (pp. 81–84). Tübingen: University Press.
- Molina, M.C.; Vicente, C.** (1995). Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts. *Cell Adhesion and Communication* 3: 1.
- Molina, M.C.; Vicente, C.** (2000). Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 300–307.
- Molina, M. C.; Vicente, C.; Pedrosa, M. M.; Legaz, M. E.** (1997). Isoforms of arginase in the lichens *Evernia prunastri* and *Xanthoria parietina*: Physiological roles and their implication in the controlled parasitism of the mycobiont. En: Schenk, H. E. A.; Herrmann, R. G.; Jeon, K. W.; Müller, N. E.; Schwemmler, W. (Ed.) *Eukaryotism and symbiosis: intertaxonic combination versus symbiotic adaptation*. (pp. 477–483). Berlin: Springer-Verlag.

- Molina, M.C.; Bajon, C.; Sauvanet, A.; Robert, D.; Vicente, C.** (1998). Detection of polysaccharides and ultrastructural modification of the photobiont cell wall produced by two arginase isoelectins from *Xanthoria parietina*. *J Plant Res*, 111: 191-197.
- Molnár K.; Farkas, E.** (2010): Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung*, 65:157–173.
- Montfort, W.; Villafranca, J.E.; Monzing, A.F.; Ernst, S.R.; Katzin, B.; Rutenberg, E.; Xoung, N.H.; Hamlin, R.; Robertus, J.D.** (1987): The three dimensional structure of ricin at 2,8 Å. *J Biol Chem*, 262: 5398-5403.
- Mounier, J.; Laurent, V.; Hall, A.; Fort, P.; Carlier, M. F.; Sansonetti, F.J.; Egile, C.** (1999). Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *Journal of Cell Science* 112, 2069-2080.
- Mooseker, M. S.; Cheney, R. E.** (1995). Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11: 633–675.
- Muller, K.** (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 9–16.
- Nan, B.; Zusman, D.R.** (2011). Uncovering the Mystery of Gliding Motility in the *Myxobacteria*. *Annu Rev Genet*, 45: 21–39.
- Naviglio, S.; Caraglia, M.; Abbruzzese, A.; Chiosi, E.; Di Gesto, D.; Marra, M.; Romano, M.; Sorrentino, A.; Sorvillo, L.; Spina, A.; Illiano, G.** (2009). Protein kinase A as a biological target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 13, 83-92.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 593–656.
- Nilsson, M.; Rasmussen, U.; Bergman, B.** (2006). Cyanobacterial chemotaxis to extracts of host and nonhost plants. *FEMS Microbiol Ecol*, 55: 382-390.
- Nimis, P.L.; Skert, N.** (1999). Introduzione al biomonitoraggio con licheni epifiti Amministrazione provinciale di Vicenza Dipartimento Ambiente. Corso di formazione. Bassano del Grappa, 16 18 Settembre, Trieste.
- Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M. & Burrige K.** *J Biol Chem*, 276: 33305–33308.
- Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D.** (1983). The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic b actin gene. *Nucleic Acid Res*, 11(6):1759-71.
- Nultsch, W.** (1962) Der Einfluss des Lichtes auf die Bewegung der Cyanophyceen-- II. Mitteilung photokinesis bei *Phormidium autumnale*. *Planta*, 57: 613–623.
- Oda T.; Namba, K.; Maeda, Y.** (2005). Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J*, 88: 2727-2736.

- Ohmori, M.** (1989). cAMP in *Anabaena cylindrica*: rapid changes in cellular levels in response to changes in extra- cellular environments. *Plant Cell Physiol*, 30: 911–914.
- Ohmori, K.; Hirose, M.; Ohmori, M.** (1993). An increase in the intracellular concentration of cAMP triggers formation of an algal mat by the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Plant Cell Physiol*, 34: 169–171.
- Ohmori, M.; Ohmori, K.; Hasunuma, K.** (1988). Rapid change in cyclic-3 ϕ , 5 ϕ -AMP concentration triggered by a light-off or light-on signal in *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol*, 150: 203–204.
- Ohmori, M.; Okamoto, S.** (2004). Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. *Photochem Photobiol Sci*, 3: 503–511.
- Ohmori, M.; Terauchi, K.; Okamoto, S.; Watanabe, M.** (2002). Regulation of cAMP-mediated photosignaling by a phytochrome in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Photochem Photobiol*, 75: 675–679.
- Okamoto, S.; Ohmori, M.** (1999). Analysis of cyanobacterial motility in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol Suppl*, 40: 35.
- Okamoto, S.; Ohmori, M.** (2002) The Cyanobacterial PilT Protein Responsible for Cell Motility and Transformation Hydrolyzes ATP. *Plant Cell Physiol*, 43 (10): 1127–1136.
- Orchard, R.; Kittisopikul, M.; Altschuler, S.; Wu, L.; Suel, G.; Alto, N.** (2012). Identification of F-actin as the dynamic hub in a microbial-induced GTPase polarity circuit. *Cell*, 17 148(4): 803–815.
- Ott, S.** (1987). The juvenile development of lichen thalli from vegetative diaspores. *Symbiosis*, 3: 57.
- Ow, M.C.; Gantar, M.; Elia, J.** (1999). Reconstruction of a cycad-cyanobacterial association. *Symbiosis*, 27: 125-134.
- Panichkin, V.B.; Arakawa-Kobayashi, S.; Kanaseki, T.; Suzuki, I.; Los, D.A.; Shestakov, S.V.; and Murata, N.** (2006). Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative pilA operons, formation of thick Pili, and cell motility. *J Bacteriol*, 188: 7696–7699
- Pankratova, E.M.** (1987). Participation of Cyanobacteria in the Soil Nitrogen Cycle and Formation of Soil Fertility. *Advances in Microbiology*, 21: 212-242.
- Paumann, M.; Regelsberger, G.; Obinger, C.; Peschek, G. A.** (2005). The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1707: 231-253.
- Parent, C. A., Blacklock, B. J., Foehlich, W. M., Murphy, D. B. & Devreotes, P. N.** (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell*, 95: 81–91.
- Paulsrud, P.** (2001). *Nostoc Symbiont of Lichens*, Diss. PhD.Uppsala University, Faculty of Science and Technology.

- Paulsrud, P.; Rikkinen, J.; Lindblad, P.** (2001). Field experiments on cyanobacterial specificity in *Peltigera aphthosa*. *New Phytol*, 152: 111-123.
- Pedrosa, M.M.; Legaz, M.E.** (1995). Separation of arginase isoforms by capillary zone electrophoresis and isoelectric focusing in density gradient column. *Electrophoresis*, 16: 659.
- Pedrosa, M.M.** (1993). Isoformas de arginasa de *Evernia prunastri*: caracterización y regulación por fenoles. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Facultad de Biología.
- Pérez-Urria, E.; Vicente, C.** (1985). Regulation of urease by urea and its precursors in the lichen *Evernia prunastri*. *Physiologia Plantarum*, 65 (4): 433–438.
- Pérez-Urria, E.; Vicente, C.** (1989). Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri* thallus. *J Plant Physiol*, 133: 692-695.
- Pérez, M.** (1999). Identificación de lectinas en frutas medicinales, su participación en la Hemaglutinación de la cepa *E. coli* enterohemorrágica 0157: H7. Tesis Doctoral.
- Peterkofsky, A.; Reizer, A.; Reizer, J.; Gollop, N.; Zhu, P.P.; Amin, N.** (1993). Bacterial adenyl cyclases. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol*, 44: 31–65.
- Peterson, D.A.; Peterson, D.C.; Reeve, H.L.; Archer, S.L.; Weir, E.K.** (1999). GTP (gammaS) and GDP (betaS) as electron donors: new wine in old bottles. *Life Sciences*, 65: 1135-1140.
- Petit, P.** (1982). Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. *New Phytol*, 91: 705–710.
- Petit, P.; Lallemand, R.; Savoye, D.** (1983). Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. *New Phytol*, 94:103–110.
- Petrescu, S.M.; A.J.; Rüdiger, H.E.F.** (1993). Purification and partial characterization of lectin from *Datura innoxia* seeds. *Phytochemistry*, 34: 343-348.
- Peumans, W.J.; van Damme, E.J.M.** (1995). Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol*, 109: 347-352.
- Piercey-Normore, M.D.; Depriest, P.T.** (2001). Algal switching among lichen symbioses. *Am J Bot*, 88: 1490–1498.
- Pitta, T.P.; Berg, H.C.** (1995). Self-electrophoresis is not the mechanism for motility in swimming cyanobacteria. *Bacteriol*, 177 (19): 5701–5703.
- Planelles, V.; Legaz, M.E.** (1987). Purification and some proprieties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci*, 51: 9-16.
- Planet, P.J.; Kachlany, S.C.; DeSalle, R.; Figurski, D.H.** (2001). Phylogeny of genes encoded for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2503–2508.

- Pouille, Y.; Tzavara, E.; Shen, T.; Lipskaya, L.; Miyamoto, N.** (1997). Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, 128: 179–194.
- Rai, A.N.** (1990). Cyanobacterial-Fungal Symbioses: the Cyanolichens. En: *Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. (pp 9–41). CRS: Boca Raton.
- Rai, A.; Bergman, B.** (2002). Cyanolichens. Biology and Environment. *Proceedings of the Royal Irish Academy* 102: 19–22.
- Rai, C.N.; Söderbäck, E.; Bergman, B.** (2000). Cyanobacterium–plant symbioses. *New Phytol*, 147 (116): 449–481.
- Rambold, G.; Friedl, T.; Beck, A.** (1998). Photobionts in lichens: possible indicators of phylogenetic relationships? *Bryologist*, 101: 392–397.
- Ran, L.; Huang, F.; Ekman, M.; Klint, J.; Bergman, B.** (2007). Proteomic analyses of the photoauto- and diazotrophically grown cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Microbiology*, 153: 608–618.
- Rasmussen, U.; Johansson, C.; Bergman, B.** (1994). Early communication in the Gunnera-Nostoc symbiosis plant induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7: 696–702.
- Rather, P. N.** (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol*, 7: 1065–1073.
- Rayment, I.; Ryniewski, W.R.; Schmidt-Bäse, K.; Smith, R.; Tomchick, D.R.; Benning, M.M.; Winkelman, D.A.; Wesenger, G.; Holden, H.M.** (1993). Three dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, 261: 58–65.
- Read, N.; Connell, S.; Adams, D.G.** (2007). Nanoscale Visualization of a Fibrillar Array in the Cell Wall of Filamentous Cyanobacteria and Its Implications for Gliding Motility. *Journal of Bacteriology*, 19: 7361–7366.
- Ren, M.R.; Hur, J.S.; Kim, J.Y.; Park, K.W.; Park, S.C.; Seong, C.N.; Jeong, I.Y.; Byun, M.W.; Lee, M.K.; Seo, K.I.** (2009). Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 47: 2157–2162.
- Richardson, D.H.S.** (1998). Medicinal and other economic aspects of lichens. En: Galun, M. (Eds.). *Handbook of Lichenology*. (pp. 93–108). CRC Press USA 3.
- Richardson, D.H.S.** (1999). War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycological Research*, 103: 641–650.
- Rikkinen, J.** (2002). Cyanolichens: An evolutionary overview. En: Rai, A.N.; B. Bergman, B.; Rasmussen, U. (Eds). *Cyanobacteria in Symbiosis*. (pp. 31–72). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

- Rippka, R., J.; Deruelles, J. B.; Waterbury, M.; Herdman, Stanier, R.Y.** (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 111: 1–61.
- Risser, D.D.; Meeks, J.C.** (2013). Comparative transcriptomics with a motility deficient mutant leads to identification of a novel polysaccharide secretion system in *Nostoc punctiforme*. *Molecular Microbiology*, 87(4), 884–893.
- Roine E.; Nunn D.N.; Paulin L.; Romantschuk, M.** (1996). Characterization of genes required for pilus expression in *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *J Bacteriol*, 178: 410-417.
- Rubik, B.A.; Koshland, D.E.** (1978). Potentiation, desensitization, and inversion of response in bacterial sensing of chemical stimuli. *Proc Nat Acad Sci USA*, 75:2820–4.
- Rundel, P.W.** (1978). The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem System Ecol.*, 6: 157-170.
- Ryan, G. B.; Borysenko, J.Z.; Karnovsky, M.** (1974). Redistribution of surface bound concanavalin A on human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*, 62: 351-365.
- Ryu, J.; Liu, L.; Wong, T.P.; Wu, D.C.; Burette, A.; Weinberg, R.; Wang, Y.T.; Sheng, M.** (2006). A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron*, 49:175–182.
- Sacristán, M.** (2009). *Acción de las lectinas fúngicas sobre la estabilidad del cloroplasto y el reconocimiento de fotobiontes de líquenes*. Tesis Doctoral, Universiad Complutense, Facultad de Biología.
- Sacristán M.; Millanes A.M.; Vicente C.; Legaz, M.E.** (2006b). Synchronic production of fungal lectin, phycobiont lectin receptors and algal division in *Evernia prunastri*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 100, 739–751.
- Sacristán, M.; Vivas, M.; Millanes, A.M.; Fontaniella, B.; Vicente, C.; Legaz, M.E.** (2007). The recognition patten of green algae by lichenized fungi can be extended to lichens containing a cyanobacterium as photobiont. En: A. Méndez-Vilas (Ed.). *Communicating Current Research and Educational topics and Trends in Applied Microbiology*. (pp. 213-219). Formatex, Badajoz.
- Sacristán, M.; Millanes, A. M.; Fonatiella, B.; Legaz, M. E.; Vicente, C.** (2008). A first attempt to elucidate the aminoacid sequence of some lichen lectins. *Phyton*, 77: 253-262.
- Sancho, L.G.** (2011). Lichens. En: Gargaud, M. (Ed.), *Encyclopedia of Astrobiology*. Chapter Nº: 878. Berlin: Springer-Verlag.
- Sancho, L.G.; Palacios, D.; Green, T.G.A.; Vivas, M.; Pintado, A.** (2011) Extreme high lichen growth rates detected in recent deglaciated areas in Tierra del Fuego. *Polar Biology*, 34: 813-822.
- Sander, E. E.; Kloostera, J.; van Delfta, S.; van der Kammena, R.A.; Collarda, J.G.** (1999). *Rac Downregulates Rho Activity. Reciprocal Balance between Both*

- Gtpases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior*. *J. Cell Biol*, 147: 1009–1022.
- Sanders, W.B.** (2005). Observing microscopic phases of lichen life cycles on transparent substrata placed *in situ*. *Lichenologist*, 37: 373–382.
- Sasaki, A. T.; Chun, C.; Takeda, K.; Firtel, R. A.** (2004). Localized RAs signalling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity and directional cell movement. *J Cell Biol*, 167: 505–518.
- Schaper, T.; Ott, S.** (2003). Photobiont selectivity and interspecific interactions in lichen communities. I. Culture Experiments with the mycobiont *Fulgensia bracteata*. *Plant Biology*, 5: 1–10.
- Sastry, S.K.; Burridge, K.** (2000). Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res*, 261 (1):25–36.
- Schmidt, A.; Hall, M. N.** (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 305–338.
- Schroeter, B.; Sancho, L.G.** (1996) Lichens growing on glass in Antarctica. *Lichenologist*, 28: 385–390
- Schuber F.** (1989). Influence of polyamines on membrane functions. *Biochemical Journal*, 260:1–10.
- Schwender, S.** (1869). Die Algentypen der Flechtengonideien. *Programm für die Rectorsfeier der Universität Basel*, 4: 1–42.
- Shoham, M.; Yonath, A.; Sussmann, J.L.; Moul, J.; Traub, W.; Kalb, A.J.** (1979). Crystal structure of demetallized Concanavalin A: the metal binding region, *J Mol Biol*, 131: 137–155.
- Shannon, L.M.; Hnkins, C.N.** (1981). Enzymatic properties of phytohemagglutinins. En: Loewus, F.A.; Ryan C.A. (Eds.). *The Phytochemistry of Cell Surface Interactions*. (pp. 93.114). New York and London: Plenum Press.
- Schulz, G.** (1955). Bewegungsstudien sowie elektronenmikroskopische Membranuntersuchungen an Cyanophyceen. *Arch Mikrobiol*, 21: 335–370.
- Schuster, M.; Treitschke, S.; Kilaru, S.; Molloy, J.; Harmer, N.J.; Steinberg, G.** (2012). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J*, 31(1): 214–227.
- Seifert, P.; Bertram, C.** (1995) Usnic acid – natural preservation from lichens. *Seifen Öle Fette Wachse*, 121: 480–485.
- Semmler, A.B.; Whitchurch, C.B.; Leech A.J.; Mattick, J.S.** (2000). Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 146: 1321–32.
- Shaevitz J.W.; Gitai, Z.** (2010). The Structure and Function of Bacterial Actin Homologs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9): 1–18.

- Sharon, N.** (1993). Carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic vie. *Trends Biochem Sci*, 18: 221-226.
- Shibata, S.** (1976). Lichen substances as the metabolites of lichen mycobionts. En: Luckner, M.; Mothes, K.; Nover, L. (Eds). *Secondary metabolism and coevolution*. (pp. 103-116). Halle: Deuche Akademie der Naturforscher Leopoldina.
- Shibata, S.; Taguchi, H.** (1967). Ocurrance of isousnic acid in lichens with reference to "isodihydrousnic acid" derived from dihydrousnic acid. *Tetrahedron Lett.* 48: 4867-4871.
- Shimmen, T.; Ridge, R.W.; Lambiris, I.; Plazinski, J.; Yokota, E.; Williamson, R.E.** (2000). Plant myosins. *Protoplasma*, 214: 1-10.
- Shiomi, D.; Sakai, M.; Niki, H.** (2008). Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J*, 27: 3081-3091.
- Siddiqui, A. M., Burchard, R.P.; and W. H. Schwarz.** (2001). An undulating surface model for the motility of bacteria gliding on a layer of non-Newto- nian slime. *Int J Non-Linear Mech*, 36: 743–761.
- Silverman, M.; Simon, M.** (1974). Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, 249: 73-74.
- Šlajcherová, K.; Fišerová, J.; Fischer, L.; Schwarzerová, K.** (2002). Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles? *Frontiers in plant science*, 3 (226): 1-8.
- Slocum, R.D.; Ahmadjian, V.; Hildreth, K.C.** (1980). Zoosporogenesis in *Trebouxia gelatinosa*: Potential for zoospore release and implications for the lichen association. *Lichenologist*, 12: 173–187.
- Small, J.V.; Gimona M.** (1998). The cytoskqleton on the vertebrate smooth mucle cell. *Acta Physiol Scand*, 164: 341-8.
- Smarda, J.; Smajs, D.; Komrska, J.; Krzyzanek, V.** S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* 33: 227-247.
- Smith, G.R.; Givan, S.A.; Cullen, P.; Sprague, G. F.** (2002). GTPase-Activating Proteins for Cdc42. *Genes & Dev*, 16: 1587-1609.
- Smit, G.; Swart, S.; Lugtengerg, B.J.; Kijne, J.W.** (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol*, 6: 2897-2903.
- Spector, I.; Braet, F.; Shochet, N.R.; Bubb, M.R.** (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and funtion of the actin cytoskeeton. *Micros Res Tech*, 47: 18-37.
- Spector, I.; Shochet, N.R.; Blasberger, D.; Kashman, Y.** (1989). Latrunculins—novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 13: 127-144.

- Steinmetz, M. O.; Stoffler, D.; Müller, S. A.; Jahn, W.; Wolpensinger, B.; Goldie, K. N.; Engel, A.; Faulstich, H.; Aebi, U.** (1998). Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J Mol Biol*, 276: 1-6.
- Stillmark, H.** (1888). Über Ricin, ein giftigs Ferment aus den Samen von *Ricinus comm.* L. und einigen andersen *Euphorbiaceen*. PhD. University of Dorpat.
- Stock, J.B.; Stock A. M.; Motten, J. M.** (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature*, 344: 395–400.
- Stocker-Wörgötter, E.** (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25: 188–200.
- Stocker-Worgotter, E.** (2001). Experimental Studies of Lichen Symbiosis: DNA-Analyses Differentiation and Secondary Chemistry of Selected Mycobionts, Artificial Resynthesis of Two- and Tripartite Symbioses. *Symbiosis*, 30: 207–227.
- Stossel, T.** (1978). The mechanism of leukocyte locomotion. En: Gallin, J.I.; Quie, P.G. (Ed.). *Leukocyte chemotaxis: methods, physiology, and clinical implications*. (pp. 143-157). New York: Raven Press, Publishers.
- Summer, J.B. (1919).** The globulins of the Jack Bean, *Canavalis ensiformis*. *J Biol Chem*, 37: 137-142.
- Summer, J.B.** (1921). Dinitrodisalicilic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry* 47: 5-9.
- Sun, S.X.; Walcott, S.; Wolgemuth, C.W.** (2010). Cytoskeletal Cross-linking and Bundling in Motor-Independent Contraction, Minireview. *Current Biology* 20, R649–R654.
- Taleisnik, S.** (2006). Sistemas avanzados por vía de la familia Rho. En: *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de la Biología celular*. 1ª ed. (pp. 127-136). Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor.
- Tamulonis, C.; Postma, M.; Kaandorp, J.** (2011). Modeling Filamentous Cyanobacteria Reveals the Advantages of Long and Fast Trichomes for Optimizing Light Exposure, 6 (7): e22084.
- Tan, L.T.** (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*, 68: 954–979.
- Tang, D.; Kubotab, Y.; Kamma, K.E.; Stull, J.T.** (1993). GTPγS-Induced phosphorylation of myosin light chain kinase in smooth muscle. *FEBS*, 13051: 331(3), 272-275
- Terauchi, K.; Ohmori, M.** (1999). An adenylate cyclase, Cya1, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*, 40: 248–251.
- Terauchi, K.; Ohmori, M.** (2004). Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Molecular Microbiology*, 52 (1): 303–309.

- Tondeleir, D.; Lambrechts, A.; Mueller, M.; Jonckheere, V.; Doll, T.; Vandamme, D.; Bakkali, K.; Waterschoot, D.; Lemaistre, M.; Debeir, O.; Decaestecker, C.; Hinz, B.; Staes, A.; Timmerman, E.; Colaert, N.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C.** (2012). Cells lacking β -actin are genetically reprogrammed and maintain conditional migratory capacity. *Molecular and Cellular proteomics*, 11 (3): 255-271.
- Tormo, A.; Vicente, M.** 1984. The ftsA gene product participates in formation of the *Escherichia coli* septum structure. *J Bacteriol*, 157: 779– 784.
- Trachtenberg, S.** (1998). Mollicutes – wall-less bacteria with internal skeletons. *J Struct Biol*, 124: 244–256.
- Trachtenberg, S.; Gilad, R.** (2001). A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3. *Mol Microbiol*, 41: 827–848.
- Unanue, E. R.; Perkins, W.D.; Karnovsky, M.J.** (1972). Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography. *J Exp Med*, 136: 885-906.
- Usmanova, A.; Astier, C.; Méjean, C.; Hubert F.; Feinberg, J.; Benyamin, Y.** (1998). Coevolution of actin and associated proteins: an α -actinin-like protein in a cyanobacterium (*Spirulina platensis*). *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 120: 693-700.
- Vale, R.D.; Milligan, R.A.** (2000). The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins. *Science*, 288 (5463): 88-95.
- van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Pusztai, A.; Bardozy, S.** (1998). En: *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. Chichester UK: John Wiley & Sons.
- van den Ent, F.; Amos L.A.; Lowe, J.** (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413: 39–44.
- van den Ent, F.; Moller-Jensen, J.; Amos, L.A.; Gerdes, K.; Lowe, J.** 2002. F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J*, 16;21(24):6935-43.
- Vavilin, D.V.; Ducruet, J.M.; Matorin, D.N.; Venediktov, P.S.; Rubin, A.B.** (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *J Photochem Photobiol B Biol*, 42: 233–239.
- van Walraven, H.S.; Lutter, R.; Walter, J.E.** (1993). Organization and sequences of genes for the subunits of ATP synthase in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* 6716. *Biochem J*, 294: 239-25.
- Vavasseur, A.; Gautier, H.; Thibaud, M.C; Lascève, G.** (1991). Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis*. *J Plant Physiol*, 139: 90-94.

- Vicente, C.; Azpiroz, A.; Estévez, M.P.; González, M.L. (1978).** Quaternary structure changes and kinetics of urease inactivation by L-usnic acid in relation to the regulation of nutrient transfer between lichen symbionts. *Plant, Cell & Environ*, 1: 29-33.
- Vicente, C.; Legaz, M.E. (1981).** Purification and properties of L-arginine decarboxylase of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Physiol*, 22: 1119-1123.
- Vicente, C.; Legaz, M.E. (1983).** Regulation of urea production in *Evernia prunastri*: effects of L-arginine metabolites. *Z Pflanzenphysiol*, 111: 123-131.
- Vicente, C.; Legaz, M.E. (1987).** Development of urease activity in isolated photobionts of *Cladonia polia*. *Endocyt Cell Res*, 4: 69-78.
- Vicente C.; Legaz, M.E. (1998).** Lichen enzymology. En: Galun, M. (Ed). *Handbook of Lichenology*. Raton, FL: CR Press, 1:239-84.
- Vicente, C.; Pérez-Urria, E. (1989).** Production and secretion of urease by *Evernia prunastri* thallus and its symbionts. *Endocyt Cell Res*, 6: 87-97.
- Vicente, C.; Vicente-Manzanares, M.; Sacristán, M.; Vivas M.; Legaz, M.E. (2008).** Molecular recognition by lichen lectins, as a primitive mechanism to discriminate between compatible and incompatible algal partners. En: Legaz, M.L. Vicente, C. (Ed). *Biochemical Responses of Plants to Invaders*. (pp. 13-32). India: Research Signpost.
- Vicente-Manzanares, M.; Koach, M.A.; Whitmore, L.; Lamers, M.L.; Horwitz, A.F. (2008).** Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *JBC*, 183 (3): 543-554.
- Vicente-Manzanares, M.; Zareno, J.; Whitmore, L.; Choi, C.K.; Horwitz, A.F. (2007).** Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *Journal Cell of Biology*, 176 (5): 573-580.
- Vicente-Manzanares M.; Ma, X.; Adelstein, R.S.; Horwitz, A.R. (2009).** Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 778–790.
- Vicente-Manzanares, M.; Horwitz, A.R. (2010).** Myosin light chain mono- and di-phosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402: 537–542.
- Villarreal, J.C.; Renzaglia, K.S. (2006).** Structure and development of *Nostoc* strands in *Leiosporoceros dussii* (Anthocerotophyta): a novel symbiosis in land plants. *American Journal of Botany*, 93: 693-705.
- Vivas, M.; Sacristán, M.; Legaz, M.E.; Vicente, C. (2010).** The cell recognition model in chlorolichens involving a fungal lectin binding to an algal ligand can be extended to cyanolichens. *Plant Biol (Stuttg)*, 12(4): 615-21.
- Volk, R.B. (2008).** Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indole alkaloid. *Microbiol Res*, 163: 307–313.

- Vollmer, W.** (2006). The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl Microbiol Biotechnol.*, 73: 37–47.
- Vollmer, W.; Seligman, S.J.** (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol*, 18: 59-66.
- von Krüger, W. M. A.; Lery, L. M. S.; Soares, M. R.; de Neves-Manta, F. S.; Batista e Silva, C.M.; da Costa Neves-Ferreira. A.G.; Perales, J.; Bisch, P.M.** (2006). The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and phoB mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*, 6: 1495–1511
- Voytsekhovich, A. O.; Mikhailyuk, T. I.; Darienko T. M.** (2011). Lichen photobionts 1: biodiversity, ecophysiology and co-evolution with the mycobiont. *Algologia*, 21(1): 3–26.
- Wall, D.; Kaiser, D.** (1999). Type 1V pili and cell motility. *Mol Microbiol*, 32: 1-10.
- Walters, R.R.** (1985). Ligands for mobilization. En: Dean, P.G.P.; WS Johnson, W.S.; Middle, F.A. *Affinity Chromatography, a Practical Approach*. (pp. 114-166) Oxford, IRL Press.
- Wang, S.; Arellano-Santoyo, H.; Combs, P.A.; Shaevitz, J.W.** (2010). Actin-like cytoskeleton filaments contribute to cell mechanics in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 9182-9185.
- Wang, J.; Song, X. J.; Ren, Z.L.; Yuan, B.; Lei.; Z.L.** (1998). Studies on immobilization of urease on cellulose acetate membrane. *Chem J Chin Univ*; 19:1104-6.
- Warburg, O. Christian, W.** (1941). Isolierung and crystallisation of garungs ferments enolase. *Biochemiche Z*, 310: 384-421.
- Wastlhuber, R.; Loos, E.** (1996). Differences between cultured and freshly isolated cyanobiont from *Peltigera* is there symbiosis-specific regulation of glucose carrier. *Lichenologist*, 28: 67-68.
- Weis, W.I.; Drickamer, K.** (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem*, 65: 441-473.
- Weisniewski, J. P.; Delmotte, F. M.** (1996). Modulation of carbohydrate- binding capacities and attachment ability of *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) to white lupin roots. *Can J Microbiol*, 42: 234-242.
- Wellburn, A. R.** (1994). The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144 (3) 307-313.
- Wen, K. K.; Yao, X.; Rubenstein, P.A.** (2002). GTP-yeast actin. *J Biol Chem*, 277: 41101-41109.
- West, A.H.; Stock, A.M.** (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 369-376.

- Wetzstein, M.; Volker, U.; Dedio, J.; Lobau, Zuber, U.; Schiesswohl, M.; Herget, C.; Hecker, M.; Schumann, W.** (1992). Cloning, sequencing, and molecular analysis of the dnaK locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 174: 3300–3310.
- Whitton, B.A.** (2012). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer, Dordrecht.
- Wickstead, B.; Gull, K.** (2011). The evolution of the cytoskeleton. *Cell Biol*, 194 (4): 513–525.
- Wilson T.** (1990). *Confocal microscopy*. London: Academic Press. Pp. 426.
- Whittaker, J. W.** (2005). The radical chemistry of galactose oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 433: 227–239.
- Wooldridge, S.A.** (2010). Is the coral-algae symbiosis really 'mutually beneficial' for the partners? *Bioessays*, 32: 615–625.
- Woo Choi, H.; Hyun Kim, N.; Kyeong Lee, Y.; Kook Hwang, B.** (2013). The Pepper Extracellular Xyloglucan-Specific Endo- β -1,4-Glucanase Inhibitor Protein Gene, *CaXEGIP1*, is Required for Plant Cell Death and Defense Responses. *Plant Physiology*, 161:384–396.
- Wolseley, P.** (1995). A global perspective on the status of lichens and their conservation. *Mitt Eidgenöss Forsch anst WSL*, 70: 11–27.
- Wornik, S.; Grube, M.** (2010). Joint Dispersal Does Not Imply Maintenance of Partnerships in Lichen Symbioses. *Microb Ecol*, 59: 150–157.
- Wozniak, M.A.; Modzelewska, K.; Kwong, L.; Keely, P.J.** (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 1692: 103–119.
- Wu, X.; Iwai, N.; Chen, W.** (2011). Effects of S-(3,4-dichlorobenzyl) isothiourea on different cellular events in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Res Microbiol*, 162(4):375–81.
- Wulf, E.; Deboben, A.; Bautz, A.; Faulstich, H.; Wieland, T.H.** (1979). Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 4498–4502.
- Xu, J.; Wang, F.; Van Keymeulen, A.; Herzmark, P.; Straight, A.; Kelly, K.; Takuwa, Y.; Sugimoto, N.; Mitchison, T.; Bourne H.R.** (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, 114: 201–214.
- Yarmola, E.G.; Somasundaram, T.; Boring, T.A.; Spector, I.; Bubb, M.R.** (2000). Actin-Latrunculin A Structure and Function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 28120–28127.
- Yashiro, K.; Sakamoto, T.; Ohmori, M.** (1996). Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Mol Biol*, 31: 175–181.

- Young, J.; Holland, I.B.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters—revisited five years on. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 177-200.9.
- Yoshihara, S.; Ikeuchi, M.** (2004). Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol Sci*, 3: 512-518.
- Yoshizawa, T.; Shimizu, T.; Hirano, H.; Mamoru Sato, M.; Hiroshi Hashimoto, H.** (2012). Structural Basis for Inhibition of Xyloglucan-specific Endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-Protein Inhibitor. *J Biol Chem*, 25 287(22): 18710–18716.
- Zechel, K.; K. Weber.** (1978). Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem*, 89:105 12.
- Zhang, Y., Ducret, A., Shaevitz, J., and Mignot, T.** (2011). From individual cell motility to collective behaviors: insights from a prokaryote, *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* 36: 149–164.
- Zheng, W.; Rasmussen, U.; Siping Zheng, Xiaodong Bao, Bin Chen, Yuan Gao, Xiong Guan, John Larsson, and Birgitta Bergman.** (2013). Multiple Modes of Cell Death Discovered in a Prokaryotic (Cyanobacterial) *Endosymbiont*. *PLoS One*, 8 (6): e66147.
- Zhu-Salzmann, K.; Hammen, P.K.; Salzman, R.A.; Koiwa, H.; Bressan, R.A.; Murdock, L.L.; Hasegawa, P.M.** (2002). Calcium modulates protease resistance and carbohydrate binding of a plant defense legume lectin, *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 132: 327-334.
- Zigmond, S.H.; Joyce, M.; Borleis, J.; Bokoch, G.M.; Devreotes, P.N.** (1997). Regulation of Actin Polymerization in Cell-free Systems by GTP γ S and Cdc42. *The Journal of Cell Biology*, 138: (2) 363–374.
- Zilliges. Y.; Kehr, J.C.; Meissner, S.; Ishida, K.; Mikkat, S.** (2011). The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of Microcystis under Oxidative Stress Conditions. *PLoS ONE* 6(3): e17615.
- Zorina, A.** (2013). Eukaryotic protein kinases in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology September*, 60 (5): 589-596.

